

**Lokalisierung der Homospermidinsynthase, dem ersten  
spezifischen Enzym der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese in den  
Wurzeln von *Senecio vernalis***

Von der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
Dissertation

von Stefanie Moll  
aus Veerßen

1. Referent: Prof. Dr. Thomas Hartmann

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Strack

eingereicht am 25.04.2002

mündliche Prüfung: 01.10.2002

2002

(Druckjahr)

## **Vorveröffentlichung der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikation**

Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T., Ober, D. (2002): Cell specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison to its ancestor, deoxyhypusine synthase; Plant Physiology 130 (1), 47-57

### **Tagungsbeiträge**

Moll, S., Ober, D., Kahmann, U., Hartmann, T.: Molecular and immunological characterization of the homospermidine synthase, the key enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis; 2000 Years of Natural Products Research, Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA und PSE, 26.07.-30.07.1999, Amsterdam

Moll, S., Ober, D.: Tissue localization of the homospermidine synthase, the key enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis; 3. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, 28.09.-30.09.2000, Halle

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Hartmann für die interessante Themenstellung sowie die konstruktiven und kritischen Diskussionen der Versuchsergebnisse.

Herrn Prof. Dr. D. Strack danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. Dietrich Ober für ein stets offenes Ohr und die vielen konstruktiven Diskussionen.

Herrn Dr. Robert Hänsch, Institut für Botanik der TU-Braunschweig, danke ich für die engagierte Einführung in die Elektronenmikroskopie sowie die zahlreichen Diskussionen.

Bei Frau Dr. Bettina Hause vom Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Arbeitsgruppe Zellbiologie der Mykorrhiza) möchte ich mich ganz herzlich, für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops und für hilfreiche Tips bezüglich der Immunolokalisation bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie, die zu dem angenehmen und kollegialen Arbeitsklima beigetragen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Frau Dr. Antje Chang und Anita Backenköhler danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Zum Schluß möchte ich mich noch bei meiner Familie und allen Freunden für ihre Unterstützung und für ihr Verständnis während der Arbeit bedanken.

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Sekundärstoffwechsel.....	1
1.2	Pyrrolizidin-Alkaloide.....	1
1.2.1	Biosynthese der PAs .....	3
1.2.2	Transport und Speicherung von PAs .....	6
1.2.3	Toxikologie und chemische Ökologie .....	7
1.3	Evolution der HSS.....	9
1.4	Problemstellung .....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien .....	13
2.2	Pflanzenmaterial .....	13
2.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	14
2.3.1	Trennung und Detektion von DNA .....	14
2.3.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	15
2.3.3	Ligation .....	15
2.3.4	Transformation.....	15
2.3.5	Führung von Bakterienkulturen.....	16
2.3.6	Gewinnung und Reinigung von Plasmid-DNA .....	17
2.3.7	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	18
2.3.8	Fällung von Nukleinsäuren .....	19
2.4	Untersuchung genomischer DNA.....	19
2.4.1	Gewinnung genomischer DNA.....	19
2.4.2	Amplifikation genomischer DNA durch PCR.....	20
2.4.3	Southern-Blot.....	22
2.4.3.1	Herstellung von DIG-Sonden.....	24
2.4.3.2	Hybridisierung .....	25
2.4.3.3	Detektion .....	26
2.5	Untersuchung von RNA (Northern-Blot).....	27
2.5.1	Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit RNA .....	27
2.5.2	RNA-Isolierung .....	28
2.5.3	Herstellung und Elektrophorese von Formaldehydgelen .....	28
2.5.4	Kapillarblot/Vakuumbiot .....	29
2.5.5	Oligo-Tailing.....	31

2.5.6 Dot-Blot.....	32
2.6 RT-PCR .....	33
2.6.1 Herstellung von cDNA .....	33
2.6.2 RT-PCR .....	33
2.7 Proteinchemische Methoden .....	35
2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....	35
2.7.2 Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) .....	35
2.7.3 Western-Blot.....	37
2.7.4 Detektion .....	38
2.7.5 Färbungen .....	39
2.7.5.1 Coomassie-Blau-Färbung .....	39
2.7.5.2 Indian-Ink-Färbung von Blotmembranen .....	39
2.7.5.3 Amidoschwarz-Färbung von Blotmembranen.....	40
2.7.6 Umpuffern, Fällern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	40
2.8 Immunologische Methoden.....	41
2.8.1 Immunisierung .....	41
2.8.2 Reinigung der HSS .....	41
2.8.2.1 Anzucht des HSS-exprimierenden <i>E.coli</i> -Stammes .....	42
2.8.2.2 Zellaufschluß .....	42
2.8.2.3 DEAE-Anionenaustauschchromatographie .....	42
2.8.2.4 Bestimmung der HSS-Aktivität .....	43
2.8.2.5 Phenylsepharose.....	44
2.8.2.6 Spermidin-Sepharose.....	44
2.8.3 Affinitätsreinigung der Antikörper.....	45
2.8.3.1 HSS-Affinitätschromatographie .....	45
2.9 Gewebeeinbettung und Schnitte.....	47
2.9.1 Gewebefixierung Einbettung.....	47
2.9.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	47
2.9.1.2 Einbettung in Paraffin .....	48
2.9.1.3 Einbettung für die Elektronenmikroskopie .....	49
2.9.2 Immunomarkierung von Gewebeschnitten .....	51
2.9.2.1 Immunogoldmarkierung und silver-enhancement.....	51
2.9.2.2 Fluoreszenzmarkierung.....	52
2.9.2.3 Befilmen von Nickelgrids .....	52

2.9.2.4 Immunogoldmarkierung für Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) .....	53
2.9.3 GUS-Färbung .....	54
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
3.1 Genomische Organisation von HSS und DHS bei <i>S. vernalis</i> .....	56
3.1.1 Amplifikation der genomischen DNA durch PCR .....	56
3.1.2 Southern-Blot-Analyse zur Klärung der Anzahl der HSS-Gene .....	62
3.1.2.1 Optimierung der Blotdurchführung .....	62
3.1.2.2 Southern-Blot mit hss-spezifischer DIG-Sonde .....	64
3.1.2.3 Southern-Blot mit der dhs-spezifischen DIG-Sonde .....	66
3.2 Vergleichende Analyse zur gewebespezifischen Expression der HSS und DHS in <i>S. vernalis</i> .....	67
3.2.1 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene .....	67
3.2.1.1 Northern-Blot .....	68
3.2.1.2 RT-PCR von <i>S. vernalis</i> und <i>N. tabacum</i> .....	71
3.2.1.3 Vergleich der Expressionsmuster .....	77
3.2.2 Expressionsanalyse auf Proteinebene .....	79
3.2.2.1 Gewinnung spezifischer Antikörper gegen die HSS und DHS aus <i>S. vernalis</i> .....	79
3.2.2.2 Kreuzreaktivität der Seren .....	79
3.2.2.3 Affinitätsreinigung der Antikörper .....	81
3.2.2.4 Western-Blot zur Bestimmung der Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS und DHS aus <i>S. vernalis</i> .....	83
3.2.2.5 Western-Blot von verschiedenen Wurzelstadien .....	86
3.3 in-situ-Lokalisation von HSS und DHS durch Immunogold-markierung mit Silver- Enhancement und Fluoreszenzmarkierung .....	87
3.3.1 Etablierung und Optimierung von Gewebeeinbettungen für Antikörpermarkierungen .....	87
3.3.1.1 Fixierung von Geweben .....	87
3.3.1.2 Einbettung für die Lichtmikroskopie .....	88
3.3.1.3 Einbettung für die Elektronenmikroskopie .....	89
3.3.2 Zelluläre Lokalisation der HSS in <i>S. vernalis</i> -Wurzeln .....	89
3.3.3 Subzelluläre Lokalisation der HSS durch Immunogoldmarkierung .....	96
3.3.4 Lokalisation der DHS mit Hilfe eines GUS-Reportergensystems .....	100

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
4.1	Vergleich der genomischen Organisation der HSS und DHS aus <i>S. vernalis</i> .... .....	101
4.2	Lokalisation von HSS und DHS .....	103
4.2.1	Bewertung der polyklonalen Antikörper gegen die HSS (SvHSS-Ak) bzw. DHS (SvDHS-Ak) aus <i>S. vernalis</i> .....	103
4.2.2	Vergleich der Expressionsmuster von hss und dhs .....	104
4.2.3	Gewebespezifische Lokalisation von HSS und DHS in <i>S. vernalis</i> .....	106
4.3	Ausblick .....	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CSPD®	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenylphosphat
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DIG	Digoxenin
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylcarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
eIF-5A	eukaryontischer Initiationsfaktor 5A
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GUS	β-Glucoronidase
HSS	Homospermidin-Synthase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
OD	Optische Dichte

O/N	über Nacht
ORF	open-reading-frame (Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIS	Präimmunserum
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
<i>R. viridis</i>	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>
<i>S. vernalis</i>	<i>Senecio vernalis</i>
SvDHS-Ak	polyklonaler Antikörper gegen die DHS aus <i>S. vernalis</i>
SvHSS-Ak	polyklonaler Antikörper gegen die HSS aus <i>S. vernalis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
WOK	Wurzelorgankultur
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid

# 1 Einleitung

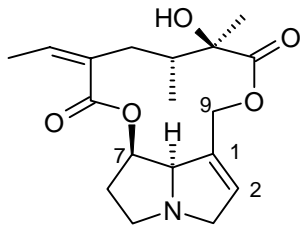
## 1.1 Sekundärstoffwechsel

Der pflanzliche Stoffwechsel läßt sich in Primär- und Sekundärstoffwechsel unterteilen. Unter den Primärstoffwechsel fallen alle Prozesse und Stoffe, die für Wachstum und Entwicklung des Individuums unentbehrlich sind. Er ist universell und hat sich im Verlauf der Evolution kaum verändert. Der Sekundärstoffwechsel hingegen umfaßt Verbindungen, deren Vorkommen auf einzelne Arten oder Artengruppen beschränkt ist und die zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen der Zelle oder des Organismus nicht notwendig sind (Hartmann, 1985). Er ist jedoch unentbehrlich für den Fortbestand der Art in ihrer Umwelt, da viele Sekundärstoffe eine Schutzfunktion gegen Herbivore, Viren und Mikroorganismen sowie gegen abiotische Faktoren vermitteln (Harborne, 1992). Ausgehend von wenigen zentralen Verbindungen des Primärstoffwechsels wie Acetyl-CoA, Mevalonat, Zimtsäure sowie wenigen Aminosäuren entsteht durch relativ einfache chemische Modifikationen eine große Vielfalt an chemischen Verbindungen. Diese Diversität ermöglicht es der Pflanze sich schneller an die sich ständig ändernde biotische und abiotische Umwelt anzupassen (Swain, 1977, Hartmann, 1996). Die Sekundärstoffe stellen also entgegen einer lange vertretenden Meinung keine nutzlosen Nebenprodukte oder Abfallstoffe des pflanzlichen Metabolismus dar (Mothes, 1955; Luckner, 1990). Bei den Pyrrolizidin-Alkaloiden (PAs) handelt es sich um eine typische Klasse sekundärer Pflanzenstoffe, an denen in unserer Arbeitsgruppe die Funktion und Komplexität des Sekundärstoffwechsels beispielhaft untersucht wird. Dabei stehen Fragen zur Biosynthese von PAs, ihrer Translokation und Speicherung, aber auch zu Interaktionen von PA-produzierenden Pflanzen mit adaptierten Insekten sowie zur Phylogenie der PA-produzierenden Pflanzen im Mittelpunkt.

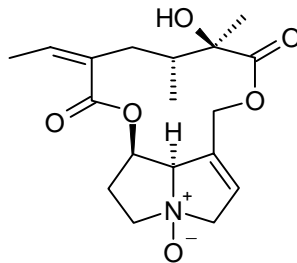
## 1.2 Pyrrolizidin-Alkaloide

Das Vorkommen von Pyrrolizidin-Alkaloiden (PAs) ist innerhalb der Angiospermen auf wenige Familien beschränkt. 95 % der PA-enthaltenden Pflanzenarten gehören zu den Asteraceae (*Senecio*, *Eupatorium*), Boraginaceae (z.B. *Heliotropium*,

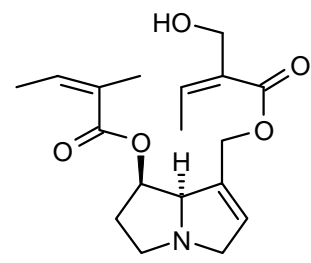
*Symphytum*) und den Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*). Vereinzelt treten sie auch in weiteren Familien wie z.B. Orchidaceae, Apocynaceae und Ranunculaceae auf (Hartmann & Witte, 1995).



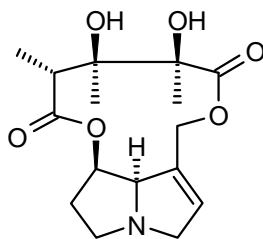
Senecionin-Typ (>100)  
Asteraceae (Senecioneae)



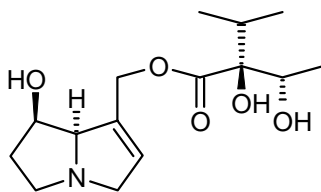
Senecionin-N-Oxid



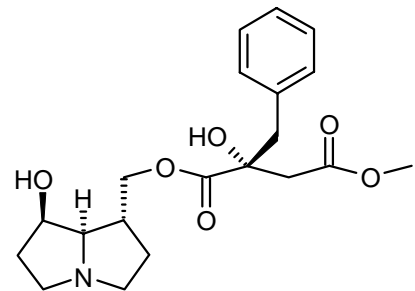
Triangularin-Typ (>50)  
Asteraceae (Senecioneae)



Monocrotalin-Typ (>30)  
Fabaceae



Lycopsamin-Typ (>100)  
Asteraceae (Eupatorieae)  
Boraginaceae



Phalaenopsin-Typ (>30)  
Orchidaceae

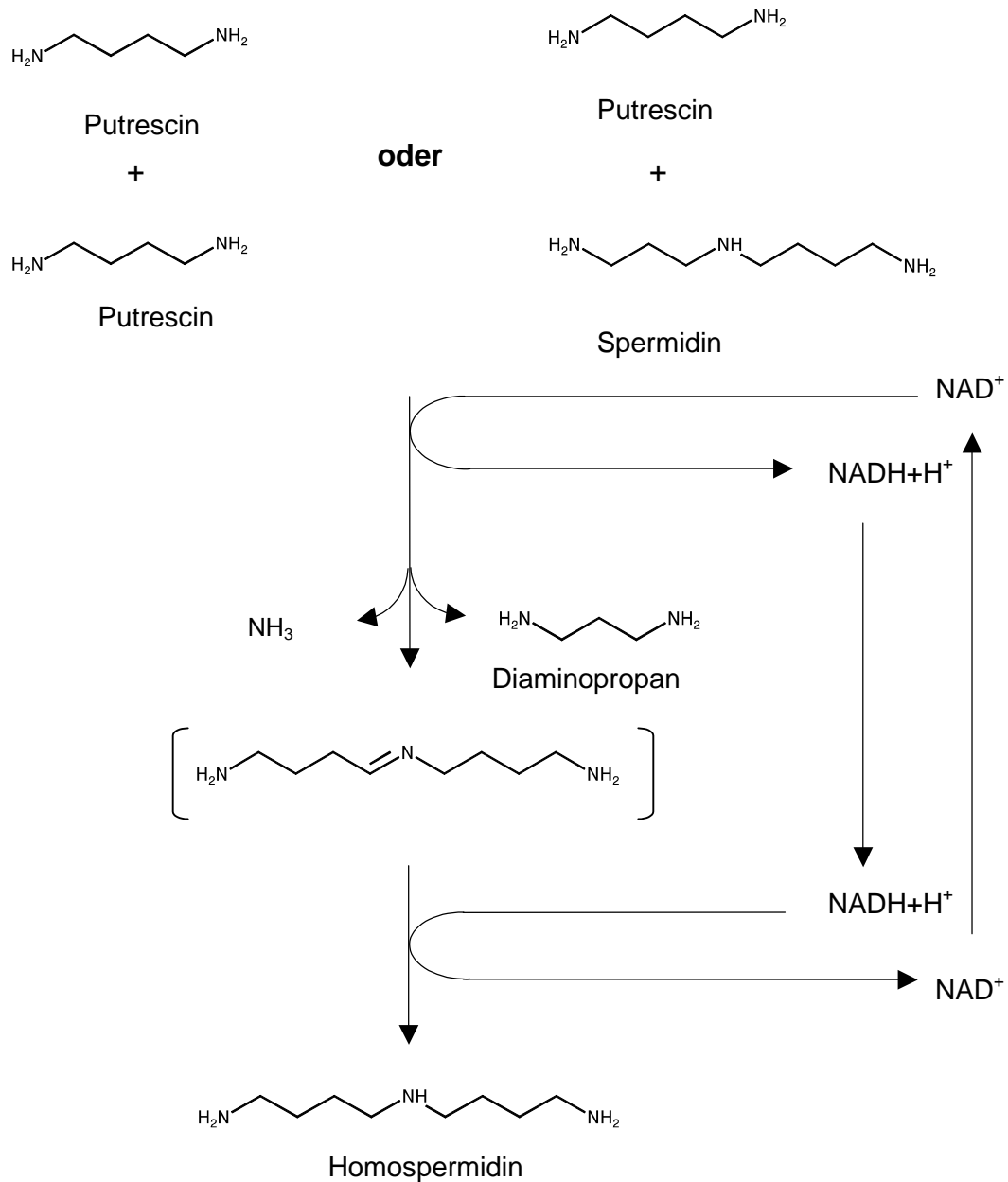
**Abb. 1.1:** Strukturtypen der PAs

Bei den PAs handelt es sich um Esteralkaloide, bestehend aus einer Necinbase, mit dem charakteristischen bityklischen Pyrrolizidinringsystem, und einer oder zwei Necinsäuren. Bisher sind mehr als 370 verschiedene PAs aus über 560 Spezies isoliert worden, die als Monoester, offenkettige Diester, meist jedoch als makrozyklische Diester vorliegen (Mattocks, 1986) (Abb. 1.1). Die Necinbasen unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Hydroxylgruppen. Zusätzlich zu der immer in Position 9 vorhandenen OH-Gruppe ist häufig eine weitere am C-Atom 7 zu finden. Die Necinbasen enthalten meistens eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 1 und 2. Aufgrund ihres Vorkommens lassen sich die PAs in fünf Grundtypen einteilen (Hartmann & Witte, 1995): Bei dem Großteil der Alkaloide handelt es sich um

makrozyklische Diester des Senecionin-Typs (charakteristisch für Senecionae, Asteraceae) und um Alkaloide vom Lycopsamin-Typ (charakteristisch für Eupatoriae, Asteraceae und Boraginaceae). Des weiteren treten bei den Asteraceae und Boraginaceae offenkettige Diester vom Triangularin-Typ und bei den Fabaceae (Gattung *Crotalaria*) zyklische Diester vom Monocrotalin-Typ auf. In allen bisher untersuchten Arten der Asteraceae, Boraginaceae und Fabaceae werden die PAs als polare, salzähnliche N-Oxide synthetisiert. Für die Familie der Orchidaceae sind PAs vom Phalaenopsin-Typ charakteristisch, die eine 1,2-gesättigte Necinbase besitzen und nur z.T. als N-Oxid vorliegen (s. Abb. 1.1).

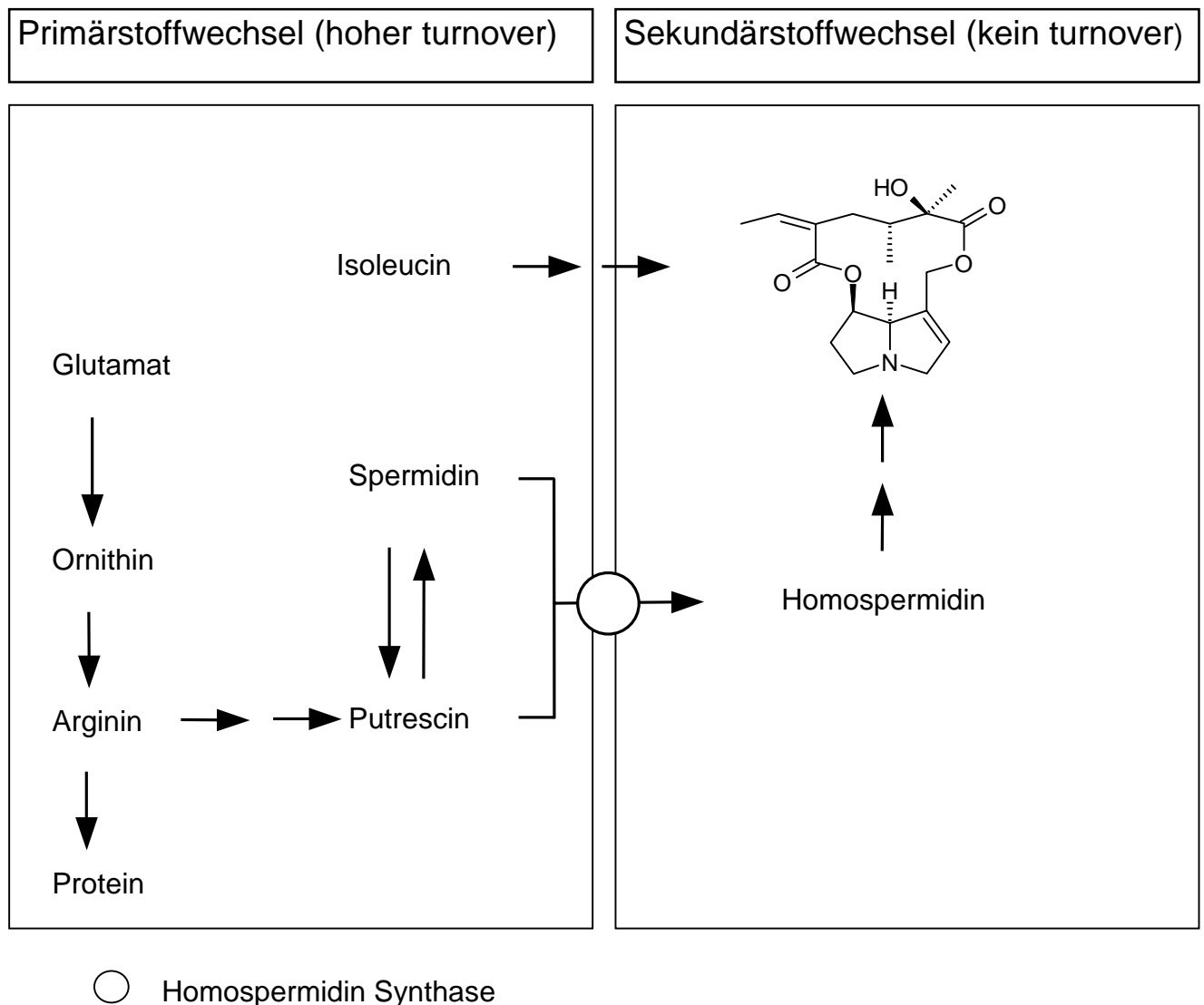
### 1.2.1 Biosynthese der PAs

Untersuchungen zur Biosynthese der PAs haben gezeigt, daß sie aus dem Aminosäurestoffwechsel hervorgehen und eng mit dem Polyaminstoffwechsel verknüpft sind (Hartmann et al., 1988). Die Necinsäure stammt von den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und seltener von Leucin ab (Robins, 1989, Herbert, 1989). Tracerexperimente von Robins (1989) und Spenser (1985) haben gezeigt, daß sich die Necinbase vom Arginin über Putrescin und Homospermidin ableitet. Die Bildung des Putrescins erfolgt dabei ausschließlich über Agmatin und N-Carbamoylputrescin. Das erste spezifische Zwischenprodukt der Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese ist das Homospermidin (Khan & Robins, 1985). Das seine Synthese katalysierende Enzym, die Homospermidinsynthase, wurde in Pflanzen erstmals von Srivenugopal und Adiga (1980) in keimenden Samen von *Lathyrus sativus* nachgewiesen. Böttcher konnte die Homospermidinsynthase in Wurzelkulturen von *Senecio* und *Eupatorium* nachweisen und als Schlüsselenzym der PA-Biosynthese identifizieren (Böttcher et al., 1993, 1994). Die Homospermidinsynthase (HSS; EC 2.5.1.45) überträgt hierbei in einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion eine Aminobutylgruppe von Spermidin auf Putrescin unter Abgabe von Diaminopropan (s. Abb. 1.2), so daß als Produkt das selten vorkommende Polyamin Homospermidin entsteht. Da das Homospermidin keinem turn-over unterliegt, nimmt die HSS eine Schlüsselrolle bei der PA-Biosynthese ein, da sie am Verknüpfungspunkt von Primär- und Sekundärstoffwechsel den Stofffluß in die PAs reguliert (s. Abb. 1.3).



**Abb. 1.2:** postulierter Reaktionsmechanismus der Homospermidinsynthese

Die weiteren enzymatischen Reaktionen vom Homospermidin bis zur Necinbase konnten bisher noch nicht charakterisiert werden. Diskutiert wird ein Dialdehyd als Intermediat, gebildet von einer Diamin-Oxidase (Robins, 1989, Böttcher et al., 1993). Die Zyklisierung eines postulierten Imminium-Ions führt anschließend zu vier Stereoisomeren des 1-Hydroxymethylpyrrolizidins, die spezifische Precursor der PAs darstellen (Rana & Robins, 1983).



**Abb. 1.3:** Stellung der Homospermidinsynthase zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel

Das Homospermidin (N-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutan) konnte außer als seltenes Polyamin in einigen Pflanzen auch in einzelnen Tieren (Matsuzaki et al., 1982) und Bakterien (Busse & Auling, 1988, Hamana & Matsuzaki, 1992) nachgewiesen werden. Kinetische Untersuchungen haben große Übereinstimmungen bezüglich des Reaktionsmechanismus zwischen der bakteriellen HSS aus *Rhodopseudomonas viridis* (EC 2.5.1.44) und der aus *S. vernalis* gezeigt (Böttcher et al., 1994, Ober & Hartmann, 1999b). Entgegen früheren Versuchen mit der nur partiell gereinigten pflanzlichen Homospermidinsynthase konnten neuere Untersuchungen mit der rekombinanten HSS zeigen, daß Putrescin bei der pflanzlichen HSS Spermidin als Aminobutyldonor nicht ersetzen kann (Ober & Hartmann, 1999b). Von der

bakteriellen HSS wird hingegen sowohl Putrescin als auch Spermidin als Aminobutyldonor akzeptiert (Ober et al., 2000).

Die HSS aus beiden Organismen wurden kloniert, sequenziert und in *E. coli* überexprimiert. Die bakterielle HSS zeigte überraschenderweise weder auf Nukleinsäure- noch auf Aminosäureebene Homologien zur pflanzlichen HSS oder anderen bekannte Sequenzen (Tholl et al., 1996, Ober & Hartmann, 1999b). Die cDNA der pflanzlichen HSS zeigte dagegen hohe Ähnlichkeiten mit Genen, die für das Enzym Desoxyhypusinsynthase codieren (s. Kap. 1.3).

### 1.2.2 Transport und Speicherung von PAs

PAs kommen bei den Asteraceae in allen Organen vor, werden jedoch bei *Eupatorium*-und *Senecio*-Arten ausschließlich in den Wurzeln gebildet. Hierbei ist die PA-Biosynthese strikt an das Wachstum der Wurzeln gekoppelt. An der Kontrolle könnte das Polyamin Spermidin beteiligt sein, das als Wachstumsfaktor in Pflanzen diskutiert wird (Hartmann et al., 1988, Sander & Hartmann, 1989, Graser & Hartmann, 2000). Der Transport der PAs erfolgt bei den Asteraceae über das Phloem an die bevorzugten Orte der Akkumulation, bei denen es sich um die peripheren Gewebe sowie v.a. um die Blütenköpfe handelt, in denen 60-80 % der gesamten PAs gespeichert werden (Hartmann et al., 1989). Daß der Transport aus der Wurzel in den Sproß ausschließlich über das Phloem erfolgt, konnte mit "Ringelungs"-Experimenten gezeigt werden. Bei diesen Experimenten werden bei einer intakten Pflanze die Phloemelemente oberhalb der Wurzel in einem Bereich von 5 bis 10 mm durch Wasserdampf abgetötet, so daß der Stofftransport nur noch über die Tracheen möglich ist. Bei Vertretern anderer Familien (z.B. *Crotalaria*, *Heliotropium*) erfolgt eine Synthese jedoch vorzugsweise im Sproß (Nowacki & Byerrum, 1962, Catalfamo et al. 1982). Bei den Boraginaceae gibt es Art-spezifische Unterschiede bezüglich der Biosyntheseorte. *Heliotropium indicum* (Frölich, 1996) und *H. spathulatum* (Birecka & Catalfamo, 1982) synthetisieren PAs im jungen Sproß. *Symphytum officinale* synthetisiert PAs ausschließlich in den Wurzeln (Frölich, 1996), *Cynoglossum officinale* dagegen sowohl im Sproß als auch in der Wurzel (Frölich, 1996, van Dam et al., 1995). Bei PA-produzierenden Orchideen der Gattung *Phalaenopsis* konnten junge Wurzelspitzen und bei *Ipomoea hederifolia* (Convolvulaceae) wiederum der Sproß als Orte der Biosynthese identifiziert werden



(Frölich, 1996, Jenett-Siems et al., 1998). Offensichtlich scheint die PA-Biosynthese grundsätzlich in jungem, wachsenden Gewebe stattzufinden.

Untersuchungen an WOK von *Senecio*-Arten haben gezeigt, daß in den Wurzeln überwiegend Senecionin-N-Oxid synthetisiert wird und in dieser Form auch transportiert wird (Toppel et al., 1987, Hartmann, 1994). Die chemischen Modifikationen dieser Grundstruktur durch Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Reduktionen, Dehydrierungen etc. finden anschließend im Sproß statt und führen zu dem artspezifischen Spektrum an PAs (Hartmann & Dierich, 1998).

Tracer-Versuche an Suspensionskulturen verschiedener *Senecio*-Arten haben ergeben, daß das polare, wasserlösliche Senecionin-N-Oxid spezifisch in der Vakuole akkumuliert wird (Ehmke et al. 1988, von Borstel et al, 1986). Kinetische Daten und Versuche zur Hemmung von ATPasen lassen außerdem auf einen Carrier-abhängigen Transport des Senecionin-N-Oxids durch den Tonoplasten in die Vakuole schließen (Ehmke et al., 1988). Die PAs können somit in ihrer polaren Form sicher in der Vakuole gespeichert und in Konzentrationen akkumuliert werden, die einen effektiven Schutz vor Herbivoren bieten.

### 1.2.3 Toxikologie und chemische Ökologie

PAs wirken auf die meisten Wirbeltiere hepato- und pneumotoxisch (Mattocks, 1986). Die giftige Wirkung der PAs tritt erst durch eine Bioaktivierung ein. Das polare N-Oxid ist an sich ungiftig, da es mit dem Urin wieder ausgeschieden werden kann. Es wird jedoch bei nicht angepaßten Insekten und Vertebraten nach Aufnahme in den Darm reduziert. Nach der passiven Aufnahme in den Körper wandeln in der Leber vorkommende P-450-Monooxygenasen das tertiäre Alkaloid in hochreaktive Pyrrolderivate um. Durch die Reaktion dieser alkylierenden Verbindungen mit nukleophilen Gruppen von Proteinen und Nukleinsäuren kommt es zu schweren Zellschädigungen (Mattocks, 1986). Über die toxische Wirkung von PAs bei Insekten gibt es bisher nur wenige Untersuchungen, doch wirken hier offensichtlich mit der von Vertebraten vergleichbare mikrosomale P-450-Enzyme (Hodgson, 1985, Frei et al., 1992). Nur wenige Vertebraten wie z.B. Meerschweinchen besitzen eine mikrosomale Multisubstrat-Flavin-Monooxygenase, die tertiäre PAs N-oxidiert. Die N-Oxidierung dient der Detoxifizierung. Das N-Oxid kann nicht mehr bioaktiviert werden und wird ausgeschieden.

Die abschreckende Wirkung der PAs für Herbivore beruht in erster Linie auf ihrer Wirkung als Repellent (Boppré, 1986). Über die Art der Wahrnehmung der PAs als giftige Substanzen und daran beteiligter Rezeptoren ist bisher allerdings noch nichts bekannt.

Einige Insekten haben im Verlauf der Evolution verschiedene Strategien der Anpassung an PA-haltige Pflanzen entwickelt. Prinzipiell können drei verschiedene Arten der Adaptation unterschieden werden. Eine Strategie besteht darin, daß die Insekten die Pflanzen als Nahrungsquelle nutzen, weil sie in der Lage sind die Alkaloide aktiv auszuscheiden (z.B. Spodoptera aus der Familie der Eulenfalter) (Lindigkeit et al. 1997). Andere Arten nutzen PA-haltige Pflanzen ebenfalls als Nahrungsquelle, verwenden die Alkaloide aber zum eigenen Schutz, indem sie die Alkaloide wieder in eine untoxische Form umwandeln und akkumulieren (z.B. in das Senecionin-N-Oxid bei *Tyria jacobaea*). Potentielle Räuber werden hierbei in der Regel durch eine aposematische Färbung abgeschreckt. Arten, die diese Strategie verfolgen gehören u.a. zu den Lepidoptera (viele Schmetterlinge und Falter), Coleoptera (einige Blattkäfer), Orthoptera (z.B. der Grashüpfer *Zonocerus*) und Homoptera (einige Aphiden). Einigen Insekten dient die PA-haltige Pflanze nicht als Futterpflanze, sondern es werden die Alkaloide aus totem oder verwelktem Pflanzenmaterial lediglich als Vorstufen zur Synthese von Pheromonen genutzt bzw. als Schutz der Eier vor Fraßfeinden. Bei dem zu den Arctiiden gehörenden Falter *Utetheisa oratrix* z.B. überträgt das Weibchen eigene und vom Männchen bei der Kopulation erhaltene PAs auf die Eier. Es werden dabei die Männchen als Paarungspartner bevorzugt, die einen hohen PA-Gehalt aufweisen. Die Höhe des PA-Gehalts wird dabei über ein Pheromon signalisiert, dessen Vorstufe PAs sind. In diesem Fall spricht man auch von "Pharmakophagie" (Boppré, 1984). Die Speicherung der PAs in Insekten erfolgt als N-Oxid oder als Glucosid (Blattkäfer).

In *Tyria jacobaeae* (Arctiidae) z. B., deren Futterpflanze die PA-haltige Asteraceae *Senecio jacobaea* ist, werden aus der Pflanze aufgenommene PA-N-Oxide im Darm zwar zu lipophilen tertiären Aminen reduziert, jedoch findet nach dem passiven Übergang in die Hämolymphe dort wieder eine N-Oxidierung statt. Dieses N-Oxid wird akkumuliert, so daß derartig angepaßte Insekten ein sicheres Prätoxin gegen Insektivoren besitzen. Aus der Haemolymphe des Nachtfalters *Tyria jacobaeae* konnte eine lösliche N-Oxidase isoliert und charakterisiert werden (Lindigkeit, 1996, Lindigkeit et al., 1997). Dieses Enzym ist im Gegensatz zu der bei den Säugetieren

verbreiteten, membrangebundenen Multisubstrat-Flavin-Monooxygenase hoch spezifisch für die potentiell toxischen PAs.

Durch dieses Wechselspiel zwischen PA-haltigen Pflanzen und Herbivoren hat sich ein System von hoher Plastizität entwickelt, das sich auf der pflanzlichen Seite durch eine Vielzahl von im Verlauf der Evolution optimierten chemischen Strukturen und auf der Seite der Herbivoren durch verschiedene Formen der Anpassung auszeichnet.

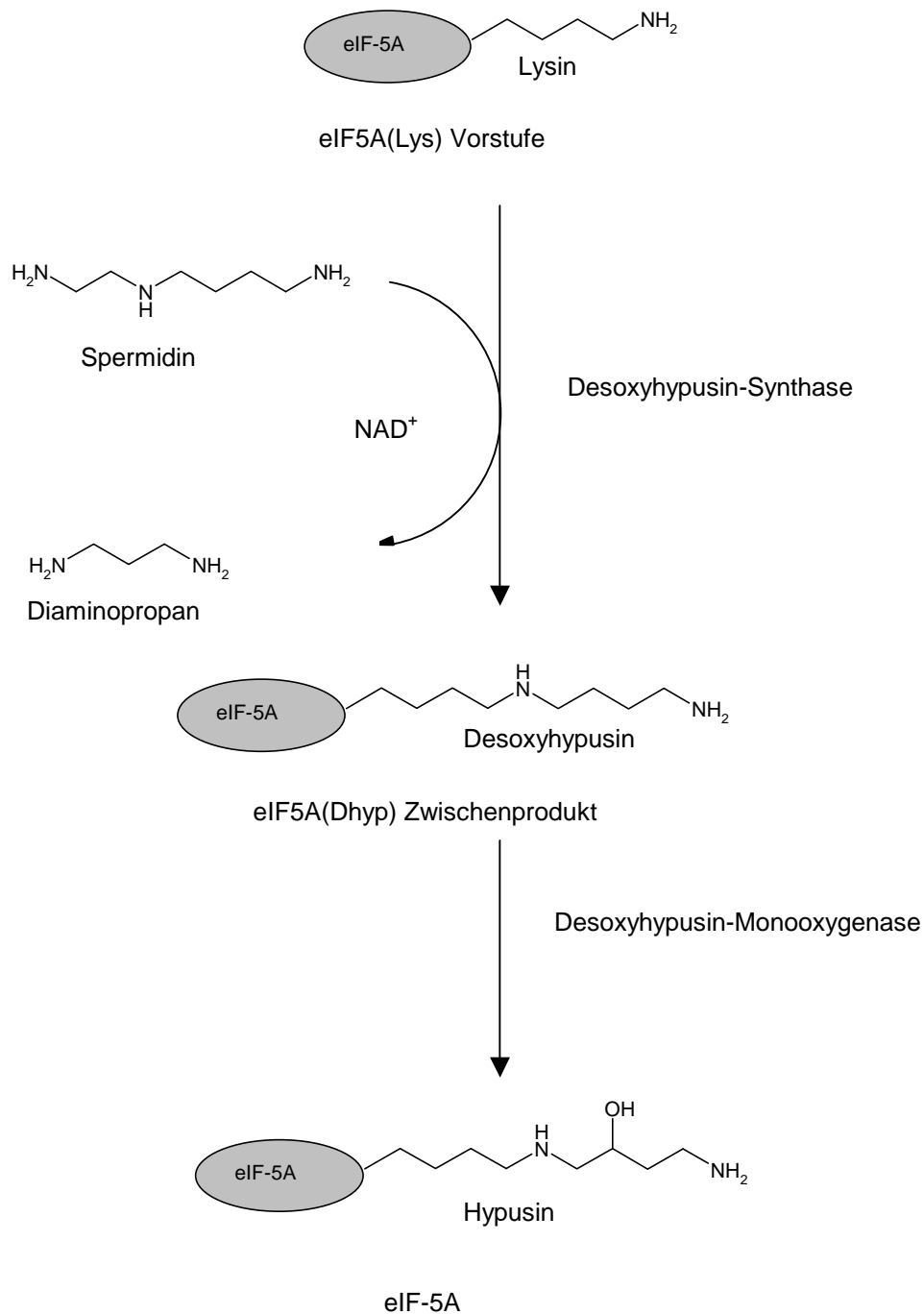
### 1.3 Evolution der HSS

Die Homospermidinsynthase katalysiert als Schlüsselenzym der PA-Biosynthese die Bildung von Homospermidin aus Putrescin und Spermidin. Das Homospermidin stellt im Gegensatz zu seinen beiden Vorstufen ein in der Natur eher selten vorkommendes Polyamin dar (Hamana et al, 1983, Srivenugopal & Adiga, 1980).

Durch Aufreinigung und Mikrosequenzierung konnte die HSS aus *S. vernalis* kloniert und funktionell expremiert werden. Durch einen Datenbankabgleich der Nukleinsäuresequenz konnte eine hohe Homologie zur Desoxyhypusinsynthase (DHS, EC 2.5.1.46) festgestellt werden (Ober, 1997). Die DHS ist an der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF5A beteiligt. Sie katalysiert den ersten Schritt der zweistufigen Modifizierung eines spezifischen Lysinrestes im eIF5A(Lys)-Vorläuferprotein zur seltenen Aminosäure Hypusin. In einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion überträgt die DHS die 4-Aminobutyleinheit eines Spermidins unter Freisetzung von Diaminopropan auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes des Vorläuferproteins (Murphey & Gerner, 1987). Im zweiten Schritt der Aktivierung wird das entstandene Desoxyhypusin durch eine Desoxyhypusin-Monooxygenase (EC 1.14.99.29) zum proteingebundenen Hypusin hydroxyliert. HSS und DHS katalysieren sehr ähnliche Reaktionen. In beiden Fällen wird in einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion die Aminobutyleinheit des Spermidins auf ein Akzeptormolekül übertragen, wobei ein Diaminopropan freigesetzt wird (s. Abb. 1.2 und Abb. 1.4).

Der eukaryontische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) kommt ubiquitär in Eukaryonten und Archaeobakterien vor (Chen & Liu, 1997). Die Funktion des eIF5A ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Das aktive eIF5A wird als zellulärer Cofaktor für die Funktion des HIV Typ 1 benötigt (Bevec et al., 1996). Bei Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) führt ein Fehlen des Faktors zu einem sofortigen Stop des Zellwachstums, aber nur

zu einer moderaten Hemmung der Proteinbiosynthese (Kang & Hershey, 1994). Dies ruft Zweifel hervor, ob die Initialisierung der Proteinbiosynthese die Hauptfunktion des Faktors ist. Weiterhin wird eine Rolle des eIF5A als Shuttleprotein am Kernporenkomplex zur Ausschleusung bestimmter mRNAs diskutiert (Rosorius et al. 1999).



**Abb. 1.4:** Reaktionsmechanismus der Aktivierung des eIF5A

Anderen Untersuchungen zufolge scheint das aktive eIF5A als spezifischer Faktor an der Expression einer Reihe von Genen beteiligt zu sein, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Park et al., 1993).

Zum pflanzlichen eIF5A gibt es bisher nur wenige Untersuchungen, doch wird auch hier aufgrund der hoch konservierten Nukleinsäuresequenz sowie des hochkonservativen Aktivierungsmechanismus eine für das Wachstum essentielle Funktion erwartet (Ober & Hartmann, 1999a).

Die Ähnlichkeiten zwischen den für die HSS und die DHS codierenden cDNAs aus *S. vernalis* betragen auf Aminosäureebene 79 % und auf Nukleinsäureebene 83%. Als weitere Gemeinsamkeit können sowohl HSS als auch DHS Homospermidin synthetisieren. Diese nahe Verwandtschaft legt zusammen mit den kinetischen Untersuchungen den Schluß nahe, daß das HSS-Gen durch Gen-Duplikation aus dem ubiquitären DHS-Gen entstanden ist und unter dem Selektionsdruck der Herbivorie beibehalten wurde, bzw. die HSS in PA-produzierenden Pflanzen als Eingangsenzym in die PA-Biosynthese nicht ausselektiert wurde. Die Rekrutierung der HSS bei PA enthaltenden Pflanzen aus dem essentiellen Gen für die DHS liefert eine Erklärung für das sporadische Vorkommen der PAs in den verschiedenen Angiospermen-Taxa. Die Untersuchung von HSS und DHS in Pflanzen verschiedener Taxa liefert die Möglichkeit, die Frage zu beantworten, ob die PAs monophyletisch oder polyphyletisch entstanden sind (Ober & Hartmann, 1999 b).

## 1.4 Problemstellung

Die Pyrrolizidinalkaloide haben sich als ein gutes Modellsystem erwiesen, um mechanistische und evolutive Fragen zum pflanzlichen Sekundärstoffwechsel zu bearbeiten. Sie stellen eine relativ junge Klasse von Sekundärstoffen dar, die ausschließlich bei den Angiospermen und dort nur in wenigen phylogenetisch nicht nahe verwandten Taxa auftreten. Das sporadische Vorkommen der PAs innerhalb der Angiospermen könnte durch zwei Mechanismen erklärt werden: zum einen durch monophyletischen Ursprung, zum anderen durch polyphyletischen Ursprung, d.h. die Fähigkeit PAs zu bilden, wurde im Verlauf der Evolution mehrfach unabhängig erworben. Vor dem Hintergrund der nahen Verwandtschaft zwischen DHS und HSS ist zum einen ein Vergleich der Intron- und Exonstruktur der beiden Enzyme von Interesse, um festzustellen ob die nahe Verwandtschaft der cDNA sich in der

genomischen Struktur widerspiegelt. Des weiteren ist ein Vergleich der gewebespezifischen Expression der beiden Enzyme innerhalb einer Art (*S. vernalis*) und das Vorkommen der DHS in zwei verschiedenen Arten, von denen die eine (*Nicotiana tabacum*) keine PAs synthetisiert, interessant.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Untersuchung der genomischen Organisation von HSS und DHS aus *S. vernalis*
- Lokalisation der Expression von HSS bzw. DHS bei *S. vernalis* und *N. tabacum* auf RNA-Ebene
- Etablierung und Optimierung von verschiedenen Methoden zur Fixierung und Einbettung von Pflanzengewebe für die immunologische Lokalisation der HSS in *S. vernalis* mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden für die Versuche der vorliegenden Arbeit Chemikalien der folgenden Firmen in "p.a." bzw. "reinst" -Qualität verwendet. Die Kits wurden, soweit nicht anders erwähnt gemäß Herstellervorschrift benutzt.

Material für die Mikroskopie:	Heraeus Kulzer, Plano
Kits für Nukleinsäureisolierungen:	Qiagen
Restriktionsenzyme:	New England Biolab, Gibco BRL
Antikörper:	Dianova
Gase:	Linde
Chromatographiematerial:	Pharmacia
Nukleinsäurehybridisierung:	Roche Diagnostics
Chemikalien allgemein:	Appligene, Biomol, Fluka, Invitrogene, Merck, Roth, Serva, Sigma

Alle wäßrigen Lösungen wurden mit MilliQ (Millipore) Wasser angesetzt.

### 2.2 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurden entweder frische *S. vernalis* -Pflanzen (im Freiland gesammelt oder aus Saatgut angezogen) oder *S. vernalis*-WOK verwendet. Die Wurzelorgankulturen (WOK) waren bereits vor Beginn der Arbeit etabliert worden (Sander, 1991) und wurden von Frau Loretta Heise kultiviert. Der Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde aus Saatgut im Gewächshaus angezogen.

## 2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Trennung und Detektion von DNA

Zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roth) hergestellt. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden Gele mit einem Agarosegehalt (w/v) von 0,8 % bis 1,5 % verwendet. Die Trennung erfolgte entweder in einer kleinen (Mini Sub Cell GT, BioRad), oder wenn mehr als 14 Proben aufgetragen wurden, in einer großen Elektrophoresekammer (Agagel Maxi, Biometra). Als Spannungsgeber diente das Gerät Consort E815 (LTF).

Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in der entsprechenden Menge Puffer (TBE) durch kurzes Aufkochen geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurden zur späteren Detektion der Nukleinsäurebanden 0,05 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro ml zugefügt und das Gel ausgegossen. Zur Größenbestimmung der DNA wurden entweder eine 1 kb- oder eine 100 bp-Leiter (Gibco) als Vergleichsstandards eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte mit etwa 5 V pro cm Elektrodenabstand in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele mit einem Multimage Lightcabinet (Biozym) dokumentiert.

#### 10x TBE-Puffer

Trisaminomethan	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	7,3 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Um den Lauf der DNA zu verfolgen und um die Dichte der Proben zu erhöhen, wurde ihnen etwa ein Drittel Volumenteil an Probenpuffer zugesetzt.



**Probenpuffer**

Xylencyanol	0,25 g
Bromphenol Blau	0,25 g
Ficoll 400	25 g
EDTA	1,46 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Die Lösung wurde filtriert und anschließend autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**2.3.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Für Restriktionsverdau und Ligation wurde die DNA unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des Qiaex II-Kits (Qiagen) eluiert. Hierbei werden DNA-Moleküle von 40 bp bis 50 kb in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an Silikatpartikel gebunden. Alle Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid, Salze und Proteine werden durch Waschschrte entfernt. Die DNA wurde anschließend mit Tris-Puffer oder Wasser eluiert.

**2.3.3 Ligation**

Nach Amplifikation der DNA durch PCR wurden die Fragmente mit der erwarteten Größe mit dem Original TA Cloning-Kit (Invitrogen) kloniert. Mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase werden die PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden und somit einen Deoxyadenosin-Rest am 3'-Ende haben, in einen linearisierten Vektor (pCR2.1) kloniert, der einen einzelnen 3' Deoxythymidin-Rest besitzt. Für die spätere Selektion besitzt der pCR2.1 eine Ampicillin-Resistenz.

**2.3.4 Transformation**

Das Ligationsprodukt wurde mit dem Original TA-Clonig-Kit in INV $\alpha$ F' -Zellen transformiert. Die Auswahl der erfolgreich transformierten Klone erfolgte durch Blau-weiß-Selektion. Diese beruht auf einer Unterbrechung des lacZ'-Gens, das für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase kodiert, durch ein Insert. Das  $\alpha$ -Fragment

bildet zusammen mit dem allein ebenfalls inaktiven  $\omega$ -Fragment eine aktive  $\beta$ -Galactosidase, die X-Gal spalten kann und für eine Blaufärbung der Kolonien sorgt. Wurde in den Vektor das Amplifikat erfolgreich hineinkloniert, kommt es zur Unterbrechung des  $\alpha$ -Fragments der  $\beta$ -Galactosidase, so daß kein aktives Enzym mehr gebildet werden kann und somit positive Klone weiß bleiben. Hierfür wurden die Transformanten auf LB-Platten mit 250  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 80  $\mu\text{g/ml}$  X-Gal ausplattiert.

### 2.3.5 Führung von Bakterienkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 5 ml LB-Medium, das 0,25 mg Ampicillin enthielt, mit dem transformierten *E.coli* Stamm beimpft und etwa 15 h bei 37°C auf dem Schüttler (250 rpm) inkubiert. Anschließend wurden zu 750  $\mu\text{l}$  der Vorkultur 250  $\mu\text{l}$  LB-Medium mit 60 % (v/v) Glycerin gegeben. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80°C.

#### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 7,5	

LB-Platten wurden aus LB-Medium hergestellt, dem 16 g/l Agar zugesetzt wurden.

#### SOB-Medium

Trypton	4 g
Hefeextrakt	1 g
NaCl	116,9 mg
KCl	37,28 mg
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
pH 7,5	
1 M MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)	1 ml
1 M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)	1 ml

**SOC-Medium**

SOB-Medium	100 ml
50 % Glukoselösung (sterilfiltriert)	0,8 ml

Alle Medien wurden vor Zugabe der sterilfiltrierten Lösungen autoklaviert.

**2.3.6 Gewinnung und Reinigung von Plasmid-DNA**

Die Reinigung von Plasmid DNA erfolgte nach einer Labormethode oder mit einem fertigen Kit (Concert Rapid Plasmid Purification System, Gibco BRL bzw. DNeasy-Kit, Qiagen). Bei letzterer wird zunächst mit einer alkalischen SDS Methode ein klares Lysat hergestellt, das die Plasmid DNA und geringe Mengen genomischer DNA enthält. Das Lysat wird auf eine Kartusche gegeben, deren Membran selektiv Plasmid-DNA adsorbiert. RNA, Proteine und andere Zellbestandteile werden mit alkoholhaltigen Waschpuffern entfernt. Die Elution erfolgt entweder standardmäßig mit 10 mM Tris-Puffer oder für Sequenzierungen mit sterilem Wasser. Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG mit Hilfe der "Dye-Terminator"-Technik durchgeführt.

**stichwortartig beschriebene Vorschrift für Miniprep nach einer Labormethode:**

- 1.) 7 ml LB-Medium+Antibiotikum (50 µg Ampicillin/ml Medium, Inkubation etwa 15 h bei 37°C)
- 2.) 1,5 ml der Vorkultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umfüllen und zentrifugieren (3 min bei 6000 rpm), Überstand restlos abnehmen
- 3.) Pellet in 200 µl Lösung I suspendieren, vortexen und kurz auf Eis stellen
- 4.) Zugabe von 400 µl Lösung II, vorsichtig mischen und genau 5 min auf Eis stellen
- 5.) Zugabe von 300 µl NH<sub>4</sub>Ac (7,5 M), 10 min auf Eis stellen, dann zentrifugieren (bei 1300 rpm) = Fällern genomischer DNA
- 6.) Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen und mit 0,6 bis 1 Volumenteilen Isopropanol versetzen, mischen, 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen und zentrifugieren (10 min bei 15000 rpm) = Fällern Plasmid-DNA
- 7.) Pellet mit 500 µl 70 %igen Ethanol waschen, zentrifugieren (3 min, 15000 rpm)
- 8.) Pellet leicht trocknen (z.B. 10 min 37°C im Heizblock oder 1 bis 2 h bei Raumtemperatur)
- 9.) Pellet auflösen in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 0,5 µl RNase Lösung (500 µg/µl) oder H<sub>2</sub>O ebenfalls mit RNase-Lösung und 1 h bei 37 °C zwecks RNA-Verdau inkubieren

**Lösung I**

Glukose	0,99 g (50 mM)
Tris	0,30 g (25 mM)
EDTA	0,37 g (10 mM)
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
pH 8,0 (eingestellt mit 5 N HCl)	

**Lösung II**

NaOH	0,08 g
SDS	0,1 g
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
(Lösung vor Gebrauch stets frisch ansetzen)	

**2.3.7 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen**

Die Konzentrationen und Reinheiten von Nukleinsäuren können photometrisch (SP8-200 UV/VIS Spectrophotometer, Pye Unicam) durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Die Bestimmungen erfolgten in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm (Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®, Hellma). Bei 260 nm entspricht eine Absorptionseinheit einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Bei 280 nm werden

Proteinkontaminationen gemessen, so daß man über den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm die Reinheit der RNA abschätzen kann. Der Wert sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen, wird jedoch sehr stark vom pH-Wert des Wassers beeinflusst.

### **2.3.8 Fällung von Nukleinsäuren**

Für die Durchführung von Southern- und Northern-Blots (s. Kap. 2.4.3 und 2.5) war es notwendig, definierte Mengen an Nukleinsäuren aufzutragen. Um dieses zu gewährleisten, können DNA bzw. RNA mit monovalenten Kationen und Ethanol gefällt werden und anschließend in der gewünschten Menge Wasser bzw. bei der RNA zur Inaktivierung von RNAsen in Formamid oder RNase-freiem Wasser wieder resuspendiert werden.

Zu der Nukleinsäure enthaltenden Lösung wurden zuerst ein Zehntel Volumenteil einer 2 M LiCl-Lösung und anschließend zwei Volumenteile absoluter Ethanol gegeben. Je nach Probenvolumen wurde mindestens 1 h bis über Nacht bei -80°C gefällt. Danach wurden die Nukleinsäuren 0,5 h bei 15000 rpm abzentrifugiert und gegebenenfalls mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

## **2.4 Untersuchung genomischer DNA**

### **2.4.1 Gewinnung genomischer DNA**

Genomische DNA wurde aus *S. vernalis* Wurzelorgankulturen nach einer Methode von Doyle & Doyle (1990) isoliert. Zunächst wurden 5 bis 7,5 ml CTAB-Isolationspuffer in einem Zentrifugenröhrchen auf 60°C erwärmt. Zwischen 0,5 und 1 g Wurzelmaterial wurden mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Dieses wurde direkt in den vorgewärmten Puffer gegeben und 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1), indem der Puffer und das Lösungsmittelgemisch vorsichtig geschüttelt wurden. Das Gemisch wurde zur vollständigen Phasentrennung bei 1600 x g (G6-RS-Zentrifuge, Beckmann) zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und mit 2/3 Volumenteilen Ethanol (absolut) zur Fällung der DNA gemischt und bei 500 x g für

2 min zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit Waschpuffer gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA) suspendiert. Zur Entfernung eventuell enthaltender RNA erfolgte ein Verdau mit RNase wie in Kap. 2.3.6 beschrieben.

### CTAB-Isolationspuffer

CTAB (2% w/v)	2 g
(Hexadecyltrimethylammoniumbromid)	
NaCl (1,4 M)	8,18 g
β-Mercaptoethanol (0,2 % v/v)	0,2 ml
EDTA (20 mM)	0,585 g
Tris (100 mM)	1,21 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
pH 8,0 (eingestellt mit 5N HCl)	

### Waschpuffer

NH <sub>4</sub> -Acetat (10 mM)	0,0771 g
Ethanol (76 % v/v)	76 ml
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

## 2.4.2 Amplifikation genomischer DNA durch PCR

Um die codierenden (Exons) und die nicht codierenden Bereiche (Introns) der Gene für die HSS und der DHS miteinander zu vergleichen, wurde mit genomischer DNA aus *S. vernalis* WOK eine PCR durchgeführt.

Hierfür wurden 240 ng genomische DNA, isoliert mit dem DNeasy-Kit (Qiagen, s. Kap. 2.3.6) eingesetzt. Als Primer dienten die entsprechenden full-length Primer bzw. ein full-length Primer kombiniert mit einem geninternen Primer (s. Tab. 2.1, Ober & Hartmann, 1999 b). Die full-length Primer dienen zur Expression der gesamten cDNA der HSS bzw. DHS aus *S. vernalis*. Die geninternen Primer stammen aus der 3'-bzw. 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Technik. Die aus der PCR

resultierenden Fragmente mit der erwarteten Größe wurden über ein Agarosegel gereinigt (s. Kap. 2.3.2 und 2.3.4) und mit dem TA-Cloning Kit (Invitrogen) kloniert.

Primer	Nukleinsäuresequenz
Exp Klon A for (full-length HSS)	5' TA TAT CAT <u>ATG</u> GCC GAG TCA AAC AAA GAA G 3'
Exp Klon A rev (full-length HSS)	5' TTA CCT GAT CAA AAA CCA TTG <u>ACT</u> TTA GAT GC 3'
D4-3 RACE 1 for (HSS)	5' CGA GAC TTC ATA TCT GTA TTG GGC ATA TAA 3'
D4-5 RACE 2 rev (HSS)	5' TCT CAA ATC AGC TCC GGG TAA AGA A 3'
Exp Klon B for (full-length DHS)	5' ATA TCT AGA <u>ATG</u> GAA GAA TCT ATG AAA CAA G 3'
Exp Klon B rev (full-length DHS)	5' TAA GGA TCC TCA GGA <u>ACT</u> CGG CTC AGC 3'
D7-3 RACE 1 for (DHS)	5' GAA TTG CGT TCG AAA GGA CTA AAT CGT ATT 3'
D7-5 RACE 3 rev (DHS)	5' GTT GTC ATT CGG CAC CAA CAA 3'

**Tab. 2.1:** Nukleotidsequenz und Verwendung der eingesetzten Primer. Bei den full-length Primern wurde das jeweilige Start bzw. Stop-Codon durch Unterstreichen hervorgehoben. for: forward Primer; rev: reverse Primer; RACE-Primer: geninterne Primer synthetisiert für 3'- bzw. 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Technik (Ober, 1999)

Die PCR wurde als ein 25 µl Ansatz wie folgt mit Taq-DNA-Polymerase von Qiagen angesetzt:

Vorlage	forward Primer (10 µM)	1 µl
	reverse Primer (10 µM)	1 µl
	genomische DNA	1 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 15 µl
Mastermix	10 x PCR-Puffer	2,5 µl
	1 mM dNTP's	5 µl
	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
	25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Um Primerdimerbildungen und Fehlhybridisierungen der Primer zu vermeiden, die zu schlechten Ausbeuten bzw. unspezifischen PCR-Produkten führen, wurde die PCR mit "hot start" durchgeführt. Hierzu wurde die Vorlage in ein PCR-Gefäß pipettiert und für 5 min auf 95 °C erhitzt (Anfangsdenaturierung). Erst danach wurde der Mastermix hinzupipettiert und die Amplifikation begonnen.

PCR-Programm:

Anfangsdenaturierung	95°C	5 min	
Zyklus Denaturierung	95°C	45 sec	} 32 Zyklen
Annealing (Amplifikation)	60°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Elongation	72°C	10 min	
4°C	∞		

### 2.4.3 Southern-Blot

Um einen Überblick zu bekommen, ob die HSS in der Wurzel durch mehrere Gene codiert wird oder verschiedene Allele vorliegen, wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Genomische DNA aus *S. vernalis* WOK wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (Biolab), *EcoRV* (Gibco) und *HincII* (Gibco) geschnitten.



**Restriktionsverdau**

10 µg DNA

50 U Restriktionsenzym (*EcoRI*, *EcoRV* oder *HincII*)

2 µl 10 x Puffer

ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgte über 3 h bei 37 °C im Thermoblock (Eppendorf).

Von der Kontroll-DNA wurden jeweils 25 pg aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Mini Sub Cell GT (BioRad) mit dem Consort E815 (LTF) als Spannungsgeber bei 5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Um die DNA einzelsträngig und besser zugänglich für die Sonde zu machen, wurde das Gel 2 x 15 min in Denaturierungslösung inkubiert, so daß das Gel mit Flüssigkeit bedeckt war. Nach kurzem Spülen in H<sub>2</sub>O wurde das Gel 2 x 15 min neutralisiert. Für den Blot wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics) verwendet, die ihre Ladung über einen weiten pH-Bereich hält und daher eine hohe Bindungskapazität gegenüber DNA und RNA unter den Standardbedingungen für Southern- und Northern-Blots (s. Kap. 2.5) hat. Die Membran wurde zunächst mit H<sub>2</sub>O benetzt und anschließend mit 20 x SSC konditioniert.

Anschließend wurde die DNA 3 - 4 h mittels Kapillarblot auf die Membran transferiert. Als Transferpuffer diente hierbei 20 x SSC (Transferpuffer). Zur Fixierung der DNA wurde die Membran 30 min bei 120 °C erhitzt, nachdem die Membran zuvor kurz in 5 x SSC (20 x SSC 1:4 verdünnt) gespült wurde.

Puffer für Blot/Hybridisierung:

	<b>Denaturierungslsg.</b>	<b>Neutralisierungslsg.</b>	<b>Transferpuffer (20 x SSC)</b>
NaOH	0,5 N	-	-
NaCl	1,5 M	3 M	3 M
Tris-HCl (pH 7,5)	0,5 M	-	-
Na-Citrat	-	-	0,3 M
pH (eingestellt mit 5 N HCl)		7,5	7,0

**Blotaufbau (luftblasenfrei):**

Glasscheibe (für gleichmäßigen Andruck)

Stapel Papierhandtücher

Nylonmembran

Gel

Whatman-3 mm-Filterpapier, das in das Puffereservoir eintaucht

Träger (Brücke) für das Gel

Reservoir mit Transferpuffer (20 x SSC)

#### 2.4.3.1 Herstellung von DIG-Sonden

Zur Durchführung der Southern-und Northern-Blots wurde eine nicht-radioaktive Markierungsmethode gewählt. Die DNA-Sonden wurden hierbei mit dem PCR DIG-Sonden Synthese Kit (Roche Diagnostics) mit Digoxigenin markierten dUTP's versehen. Dabei wird Digoxigenin-11-dUTP durch die Taq-DNA-Polymerase während der PCR in die DNA eingebaut (s. Tab. 2.2). Digoxigenin ist das Aglykon eines Cardenolids, das in den Blüten und Blättern von *Digitalis*-Arten vorkommt. Bei der immunologischen Detektion kommt ein spezifischer Digoxigenin-Antikörper zum Einsatz, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist (s. Kap. 2.4.3.3). Die PCR wurde mit einem "hot start" gemäß Kap. 2.4.2 durchgeführt.

Vorlage	forward Primer (10 µM)	1 µl
	reverse Primer (10 µM)	1 µl
	Plasmid-DNA, die Template für die entsprechende Sonde enthält	25 pg
	H <sub>2</sub> O	ad 15 µl
Mastermix	10 x Puffermix	2,5 µl
	10 mM dNTPs	1,25 µl
	DIG-Enzymmix	0,375 µl
	PCR-DIG-Mix	1,25 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 10 µl
	Gesamt	25 µl

**Tab. 2.2:** PCR-Ansätze für die Herstellung der DNA-Sonden (PCR DIG Probe Synthesis Kit; Roche Diagnostics)

#### PCR-Programm:

95°C	5 min	} 20 Zyklen
95°C	45 sec	
60°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

#### 2.4.3.2 Hybridisierung

Die Membranen wurden zusammen mit Standardpuffer oder alternativ in DIG Easy Hyb (Roche) in Gefrierfolie eingeschweißt und zwischen 1 bis 2 h im Wasserbad bei 37°C bzw. für stringenter Hybridisierungen bei 42°C prähybridisiert. Für 100 cm<sup>2</sup> Membran wurden etwa 20 ml Puffer benötigt. Bevor die DIG-Sonde eingesetzt werden konnte, mußte sie 10 min bei 95°C denaturiert werden. Für die Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde wurden die Blots über Nacht gemäß ihrer

Prähybridisierungstemperatur inkubiert. Hierfür wurden 4 µl denaturierte DIG-Sonde mit 3 ml Hybridisierungspuffer (entsprechend der Prähybridisierung) verdünnt. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen 2 x 15 min in Waschlösung (2 x) gewaschen, um nicht gebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde nochmal stringenter mit Waschlösung (0,5 x) bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen, da eine geringere Ionenstärke die Stabilität von Nukleinsäurehybriden herabsetzt.

#### **Standardpuffer für Hybridisierung**

5 x SSC  
 0,1 % Na-Lauroylsarcosin (sterilfiltriert)  
 0,02 % SDS (sterilfiltriert)  
 2 % Blocking-Reagenz (Roche  
 Diagnostics)  
 50 % Formamid (deionisiert)

#### **deionisiertes Formamid**

50 g Ionenaustauscher (Serdolith MB,  
 Serva) mit 500 ml Formamid 30 min  
 langsam schütteln und anschließend  
 den Ionenaustauscher abfiltrieren,  
 deionisiertes Formamid wurde  
 jedesmal vor Gebrauch frisch  
 hergestellt

#### **2 x Waschlsg.**

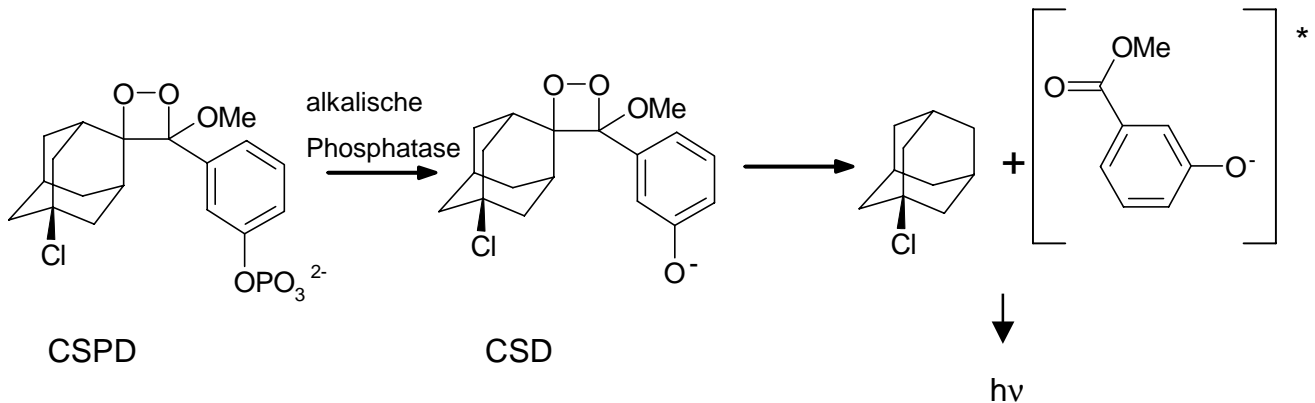
2 x SSC  
 0,1 % SDS (sterilfiltriert)

#### **0,5 x Waschlsg.**

0,5 x SSC  
 0,1 % SDS (sterilfiltriert)

#### **2.4.3.3 Detektion**

Nach den Waschgängen wurden die Membranen gemäß der Anleitung für die Detektion DIG markierter Antikörper mit CSPD (Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenylphosphat, Roche Diagnostics) entwickelt. Hierzu werden die hybridisierten Proben mit anti-Digoxigenin Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind und dem Phosphatase-Substrat CSPD detektiert. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD durch die alkalische Phosphatase führt zu einer Lichtemission bei 477 nm (s. Abb. 2.1), die mit einem Röntgenfilm (X-OMAT, XAR-5, Kodak) detektiert wird. Die Expositionszeit beträgt zwischen einer und mehreren Stunden.



**Abb. 2.1:** Schema der Chemolumineszenzreaktion von CSPD

Entwickelt werden die Filme mit G150-Entwickler (Agfa) und fixiert mit RP X-Omat L0 (Kodak).

Um den Blot anschließend gegebenenfalls mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, wurde die alte Sonde entfernt, indem die Membran 1 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend in der "Stripping"-Lösung bei 37°C inkubiert wurde. Digoxigenin-11-dUTP's sind alkalilabil und können daher leicht mit alkalischen "stripping"-Lösungen entfernt werden. Zum Schluß wurde nochmals gründlich mit 2 x SSC gewaschen, bevor die erneute Prähybridisierung erfolgte. Diese Methode zur Sondenentfernung erwies sich jedoch als nicht erfolgreich (s. Kap. 3.1.2.1).

### "Stripping"-Lsg. für Southern-Blot

0,2 N NaOH mit 0,1 % SDS

## 2.5 Untersuchung von RNA (Northern-Blot)

### 2.5.1 Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit RNA

Bei der Durchführung der Northern-Blots waren eine Reihe besonderer Vorkehrungen notwendig, um die RNA vor dem Abbau durch die sehr widerstandsfähigen Ribonukleasen (RNasen) zu schützen. Die verwendeten Plastikgeräte wie z.B. die Elektrophoresekammer wurden vor Gebrauch mit DMPC-H<sub>2</sub>O (s. Kap. 2.5.4) gespült. Alle Puffer wurden mit DMPC-H<sub>2</sub>O angesetzt, zur Inaktivierung der RNasen mindestens 10 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert. Beim Autoklavieren zerfällt DMPC und kann nicht mehr zu unerwünschten Reaktionen mit der RNA führen. Eine Ausnahme bei der Herstellung stellten z.B. die Tris enthaltenden Puffer dar, da DMPC

nicht nur mit den Aminogruppen der RNasen, sondern auch mit denen des Tris reagieren würde. Tris-Puffer wurden daher mit bereits autoklaviertem DMPC-H<sub>2</sub>O angesetzt, um eine RNase-Kontamination möglichst gering zu halten.

### **DMPC-H<sub>2</sub>O**

1 % DMPC wurden in 50 % igen Ethanol/Wasser-Gemisch (v/v) gelöst und 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt (Endkonzentration des DMPC 0,1 %).

Das DMPC- H<sub>2</sub>O wurde mindestens 10 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das DMPC durch Autoklavieren inaktiviert.

### **2.5.2 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen wurden der RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei wird das homogenisierte Pflanzenmaterial in Gegenwart eines Guanidinisothiocyanat enthaltenden Puffers, der RNasen sofort inaktiviert, lysiert. In Gegenwart von Ethanol bindet die RNA an eine auf Silicium-Gel basierende Membran, von der die gereinigte RNA mit Wasser wieder eluiert werden kann. Mit dem RNeasy-Kit können alle RNA-Moleküle isoliert werden, die mehr als 200 Nukleotide enthalten.

### **2.5.3 Herstellung und Elektrophorese von Formaldehydgelen**

Für die Herstellung der Formaldehydgele wurden in einem sterilen Kolben 1,2 % Agarose (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roth) zusammen mit DMPC-H<sub>2</sub>O (s. Kap. 2.5.1) geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurden ein Zehntel Volumenteile 10 x MOPS und 2% Formaldehyd sowie 0,025 µl/ml Gel an Ethidiumbromid zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Gellösung in die Gelkammer gegossen. Die Gelstärke durfte nicht mehr als 5 mm betragen, da sonst die RNA nicht quantitativ transferiert werden konnte. Die Gele wurden für die Blots mit 10 µg RNA pro Proben tasche beladen. Zuvor wurde die RNA 10 min bei 65°C in Probenpuffer denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Hierfür wurden zwei Drittel RNA-Probe mit einem Drittel Probenpuffer gemischt. Die Gelkammer wurde zunächst nur bis zum Rand des Gels mit 1 x MOPS gefüllt und erst nachdem die Proben in das Gel gelaufen waren, ganz aufgefüllt, da der Probenpuffer kein Glycerin zur Dichteerhöhung enthielt, um eine

weitere RNase-Kontamination zu vermeiden. Die Spannung betrug während des Laufs etwa 3 V/cm Elektrodenabstand. Die Elektrophoresen wurden entweder in der Mini Sub Cell GT (BioRad) oder, wenn mehr als 14 Proben aufgetragen wurden, in der Agagel Maxi (Biometra) mit dem Consort E815 (LTF) als Spannungsgeber durchgeführt.

**10 x MOPS-Puffer**

200 mM Morpholinopropansulfonsäure

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

pH 7,0

Beide Puffer wurden mit DMPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

**RNA-Probenpuffer**

250 µl Formamid (deionisiert)

83 µl Formaldehyd, 37 % (w/v)

50 µl 10 x MOPS-Puffer

**2.5.4 Kapillarblot/Vakuumblot**

Die RNA wurde ebenso wie die DNA (2.4.3) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics) geblottet. Vor dem Blot wurde zur Entfernung des Formaldehyds das Gel 10 min in Transferpuffer (20 x SSC, s. Kap. 2.4.3 bzw. 5 x SSC mit 10 mM NaOH) gespült. Der Blotaufbau entsprach dem des Southern-Blots (s. Kap. 2.4.3). Die Transferzeit betrug 3-4 h.

Parallel dazu wurde auch ein Vakuumblot durchgeführt, um zu testen, welche Methode den effizientesten Transfer ermöglicht. Der Vakuumblot wurde bei 20 bis 50 mbar Unterdruck über 2-3 h durchgeführt (Vacuum Blotter, Appligene). Zur Optimierung dieser Methode wurden verschiedene Druckeinstellungen (20 bis 50 mbar) und Blotzeiten (2 bis 12 h) ausprobiert.

**Blotaufbau (von oben nach unten):**

Gel bedeckt mit Transferpuffer

Plastikschablone

Nylonmembran

Whatman 3 mm Papier

Vakuumblotter

Um ein ausreichendes Vakuum zu erzeugen wurden die Bereiche der Fritte, die außerhalb des Gels lagen, mit einer Plastikschablone abgedeckt.

Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte gemäß des Protokolls für den Southern-Blot (s. Kap. 2.4.3.2), jedoch wurde anstatt des Standard-Hybridisierungspuffers entweder High-SDS-Hybridisierungspuffer oder DIGEasyHyb

(Roche Diagnostics) verwendet. Ebenso wie beim Southern-Blot kann auch beim Northern-Blot die alte Sonde entfernt und die Hybridisierung erneut durchgeführt werden. Hierzu wurde die Membran mit einer bis kurz vor dem Siedepunkt erhitzten 0,1 %igen (v/v) SDS-Lösung übergossen und anschließend 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Als Alternative wurde die Membran zweimal 0,5 h bei 68°C in einer speziellen "Stripping"-Lösung inkubiert und vor der Prähybridisierung noch einmal mit Wasser und zweimal mit 2 x SSC gespült.

### **High-SDS-Hybridisierungspuffer**

30 x SSC (autoklaviert)	83 ml
1 M Natriumphosphat (pH 7,0) (autoklaviert)	25 ml
10 % Blockingreagenz (Roche Diagnostics, autoklaviert)	100 ml
10 % N-Lauroylsarcosin (sterilfiltriert)	5 ml
Formamid (deionisiert)	250 ml

Alle Lösungen für den High-SDS-Hybridisierungspuffer wurden mit DMPC-H<sub>2</sub>O angesetzt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert und die Lösungen zusammen mit 35 g SDS erhitzt, bis sich dieses gelöst hat. Nach Zugabe des Formamid wurde mit DMPC-H<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt. Die Lösung kann so bei Raumtemperatur gelagert werden und wurde vor Gebrauch auf 65 °C erhitzt.

### **"Stripping"-Lsg. für Northern-Blot**

50 ml Formamid  
50 ml Tris-HCl (50 mM pH 8,0)  
1 g SDS



### 2.5.5 Oligo-Tailing

Als Sonden mit hoher Spezifität sollten Oligonukleotide für Northern-Blots eingesetzt werden, die mit der PCR amplifiziert und an ihrem 3' Ende markiert wurden. Mit Hilfe der Primer (s. Tab. 2.3) wurden die Bereiche des HSS bzw. DHS Gens amplifiziert, die Unterschiede zwischen diesen beiden Genen aufwiesen. Die entstehenden Oligonukleotidsonden sollten somit eine höhere Spezifität aufweisen, als die Sonden, die den gesamten codierenden Bereich des jeweiligen Gens umfassen (s. Kap. 2.4.3.1).

Primer	5' Nukleinsäuresequenz 3'
Klon AA oligo for 12-33	ATA TAT TCT AGA AAA CAA AGA AGC (AC)AT CGA T
Klon AA oligo rev 36-12	CGC ACT GTC GAT (GT)GC TTC TTT GTT T
Klon B oligo for 13-33	TTA ATA TCT AGA TGA AAC AAG CCT CGG TGA TG
Klon B oligo rev 38-15	TTC TCC ATC ACC GAG GCT TGT TTC

**Tab. 2.3:** Sequenz der Primer für die Oligonukleotid-Synthese

Die Markierung erfolgte mit einer terminalen Transferase (GibcoBRL) und einem 1:10 Gemisch von DIG-dUTP/dCTP. dATP hat zwar eine höhere Markierungsrate, jedoch besteht die Gefahr, daß es sich an T-reiche Regionen anlagert, so daß auf dCTP zurückgegriffen wurde. Die durchschnittliche Länge der 3'endständigen Markierungen beträgt hierbei 25 Nukleotide und trägt durchschnittlich 2,5 DIG-dUTP/tail.

Die Markierungsreaktion wurde nach folgendem Protokoll (verändert nach Schmitz et al. 1991) durchgeführt:

Ansatz:

5 x Reaktionspuffer (für terminale Transferase)	4 µl
DIG dUTP (1mM) (Roche)	0,9 µl
dCTP (100 mM) (Roth)	0,1 µl
Terminale Transferase(15 U/µl)	3,3 µl
Oligonukleotid (100 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

- Ansatz kurz vortexen und abzentrifugieren
- 15 min bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 1 µl Stop-Lösung [200 µl 0,2 M EDTA pH 8 + 1µl Glycogen (20µg/µl)]
- Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % eiskalten Ethanol
- 3 h bei -20°C präzipitieren
- 15 min bei 4°C zentrifugieren (15000 rpm; Zentrifuge Sigma 1K15)
- Vakuumtrocknung des Pellets in SpeedVac (Biometra)
- Pellet wurde in 20 µl DMPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen

Die Oligonukleotidsonden wurden für eine spezifische Markierung der mRNA bei Northern-Blots der HSS und DHS eingesetzt. Hybridisierung und Detektion erfolgten wie bereits beschrieben (s. Kap. 2.5). Zur Optimierung der Hybridisierung wurden unterschiedliche Temperaturen (37°C, 42°C, 49°C, 52°C) getestet.

### 2.5.6 Dot-Blot

Um die Spezifität oder die Markierung einer Sonde zu testen, wurden sogenannte Dot-Blots durchgeführt. Eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics) wurde hierzu erst kurz mit H<sub>2</sub>O benetzt und anschließend mit Transferpuffer (s. Kap. 2.4.3) konditioniert. Sollte die Spezifität der Sonde überprüft werden, wurde die zu untersuchende Nukleinsäure vorsichtig auf die Membran getropft und bei 120°C im Trockenschrank für 30 min fixiert. Zur Untersuchung der Sondenspezifität, wurde bei der Hybridisierung und Detektion wie beim Southern-Blot (s. Kap. 2.4.3.2 und 2.4.3.3), verfahren. Für die Überprüfung der Markierung konnte die Sonde (2µl) direkt auf die

Membran appliziert werden und unmittelbar mit der Detektion (s. Kap. 2.4.3.3) begonnen werden.

## 2.6 RT-PCR

### 2.6.1 Herstellung von cDNA

Bei der reversen Transkription dient die in der isolierten Gesamt-RNA (s. Kap. 2.5.2) enthaltende mRNA als Template für die Synthese der cDNA. Hierfür wird eine reverse Transkriptase benötigt und ein Oligo-T-Primer (5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'), der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet.

#### Ansatz

Gesamt-RNA (2 µg)	x µl
Oligo-T-Primer (1 pmol/µl)	5 µl
DMPC-H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Ansatz 10 min auf 70°C erhitzen  
sehr kurz auf Eis stellen, dann:

5 x First Strand-Puffer	10 µl
DTT ( 0,1 M)	5 µl
dNTP's (je 10 mM)	2,5 µl

für 2 min bei 42°C temperieren, dann:

<u>RT-Superscript II (200 U/µl)</u>	<u>2,5 µl</u>
Endvolumen	50 µl

für 60 min bei 42°C inkubieren,  
dann 15 min bei 70°C inaktivieren,  
Probe anschließend bei -18°C einfrieren.

### 2.6.2 RT-PCR

Um die Expressionsstärke von Genen in verschiedenen Geweben zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Für die PCR wurde ein Standardansatz (s. Tab. 2.4) gewählt und nach 26, 28, 30, 32, 34, 40 Zyklen wurden jeweils 4 µl des

Reaktionsansatzes abgenommen, mit Probenpuffer versetzt und im Vergleich zu einer 100 bp-Leiter (Gibco) auf einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt.

Vorlage	Expressionsprimer forward	2 µl
	Expressionsprimer reverse	2 µl
	cDNA	1 µl
	H <sub>2</sub> O	25 µl
Mastermix	10 x Puffermix	5 µl
	10 mM dNTPs	1 µl
	Taq-Polymerase (5 U/µl) (Gibco)	0,25 µl
	50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
	H <sub>2</sub> O	12,25 µl
	Gesamt	50 µl

**Tab. 2.4:** Ansatz für die RT-PCR; als Primer dienten die Expressionsprimer (Primer, die den cDNA-Bereich des entsprechenden Gens amplifizieren), es handelt sich dabei um Primer für die HSS aus *S. vernalis*, die DHS aus *S. vernalis* bzw. die DHS aus *N. tabacum*

PCR-Programm:

95°C	5 min	} 40 Zyklen
95°C	45 sec	
57°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Nachdem die Proben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt worden waren, wurde verglichen, welche cDNA zuerst Amplifikate zeigte.

## 2.7 Proteinchemische Methoden

### 2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Proben erfolgte mit einer photometrischen Methode nach Bradford (1976). Diese beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm, wenn Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine bindet. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Messung wurden von den Proben 20 µl für den Standardansatz bzw. 100 µl für den Mikroansatz mit je 1 ml Bradfordreagenz versetzt und in Halbmikroküvetten der Schichtdicke 1 cm vermessen (Ultrospec II 4050 UV/Visible Spectrophotometer oder Novaspec II, Pharmacia). Für jede Messung wurden Eichgeraden (Standardansatz mit 0,1 bis 1 mg/ml, Mikroansatz 10 bis 100 µg/ml) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Bezugsprotein erstellt.

#### Bradfordreagenz

100 mg Serva Blau G wurden in 50 ml 95 %igen (v/v) Ethanol vollständig gelöst, mit 100 ml 85 %iger (v/v) Phosphorsäure versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt sowie anschließend filtriert.

### 2.7.2 Herstellen von SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinuntereinheiten. Außerdem wird sie beim Western-Blot (s. Kap. 2.7.3) eingesetzt, der für die Überprüfung der Antikörper notwendig war. In dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Laemmli-System (Laemmli, 1970) mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Als Elektrophorese-Apparatur diente das Mini Protean II Electrophoresis System (Bio Rad) mit dem Multidrive XL als Spannungsgeber.

Da die vier Untereinheiten der HSS aus *S. vernalis* ein Molekulargewicht von 44,5 kDa haben, wurden für die Trennungen 12 %ige Gele verwendet, die Proteine in diesem Größenbereich optimal trennen. Die Gelstärke betrug 0,75 mm. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt und für 10 min im Thermoblock auf 95°C erhitzt. Es wurden maximal 15 µl in die Taschen aufgetragen. Für die Größenbestimmung lief eine 10 kDa Proteinleiter (Gibco BRL) mit. Die

Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Elektrodenpuffer bei einer Spannung von 200 V und bei einer Anfangsstromstärke von 75 mA durchgeführt. Die maximal zulässige Leistung betrug 15 Watt.

### 2 x Probenpuffer

	[ ml ]
H <sub>2</sub> O	2,7
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,0
Glycerin	2,0
10 % (w/v) SDS-Lsg.	3,3
2-β-Mercaptoethanol	0,5
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	0,5

### 10 x SDS-Elektrodenpuffer

Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
(pH-Wert wird nicht nachgestellt!)	

	12 % iges Trenngel [ ml ]	Sammelgel [ ml ]
H <sub>2</sub> O	3,3	3,4
30 % Acrylamid-Mix	4,0	0,83
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,63
10 % (w/v) SDS-Lsg	0,1	0,05
10 % (w/v) APS-Lsg.	0,1	0,05
TEMED	0,004	0,005
	10 ml	5 ml

### 2.7.3 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine (s. Kap. 2.7.2) auf eine Membran übertragen. Als Blot-Membran diente eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon P, Millipore). Für die hier verwendete sogenannte Semi-Dry-Methode wurde die Multiphor II Nova Blot electrophoretic transfer unit und der Multidrive XL (beide Pharmacia) als Spannungsgeber verwendet. Die Membran wurde vor der Verwendung zunächst mit Methanol benetzt und anschließend ebenso wie die 4 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier mit 1 x Blotpuffer konditioniert. Die Graphitplatten wurden gut mit 1 x Blotpuffer befeuchtet und wie folgt geschichtet:

Anode (+, obere Graphitplatte)  
2 Lagen Whatman  
Immobilon P-Membran  
Gel  
2 Lagen Whatman  
Kathode (-, untere Graphitplatte)

Der Transfer erfolgte für ein Gel bei 120 mA/15 Watt bzw. für zwei Gele bei 160 mA/15 Watt.

#### 10 x Blotpuffer

Tris-Base	58,0 g
Glycin	29,0 g
SDS	3,7 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### 1 x Blotpuffer

10 x Blotpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 2.7.4 Detektion

Im Rahmen der immunologischen Arbeiten wurde die Detektion mit einem Goat Anti Rabbit Antikörper konjugiert mit einer Meerettich-Peroxidase (Dianova) als sekundären Antikörper durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blocken, wurde sie zunächst über Nacht bei 4°C oder 1 h auf dem Schüttler bei RT mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) oder Pferdeserum (beide von Sigma) in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem gereinigten polyklonalen Antikörper anti-HSS bzw. anti-DHS in TBS-T (mit 10 % FCS) in einer 1:20000 Verdünnung 1 h inkubiert und dann je zweimal 5 min mit den folgenden Puffern gewaschen: TBS-T, TBS-T+NaCl, TBS-T+Triton, TBS-T. Danach wurde mit dem sekundären Antikörper (1:5000) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nochmals nach obigen Waschschemata behandelt und mit Hilfe des ECL Detektions Kit (Amersham Pharmacia Diagnostics) entwickelt. Das Prinzip des Kits beruht auf der oxidativen Spaltung des Substrats Luminol durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerettich-Peroxidase. Das oxidierte Produkt emittiert Licht, das eine Schwärzung eines aufgelegten Films bewirkt. Gleiche Volumina der beiden Detektionslösungen wurden miteinander gemischt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Für die Exposition mit dem Röntgenfilm wurde die Membran zwischen zwei Overheadfolien gelegt und zwischen 15 sec und 5 min exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte gemäß Kapitel 2.4.3.3.

#### Tris-buffered-saline (TBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Tris Base	3,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH	8,0

#### TBS-T

TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

#### TBS-T+Triton

TBS mit 0,5 % (v/v) Triton X100

#### TBS-T+NaCl

TBS mit 0,5 M NaCl



## 2.7.5 Färbungen

### 2.7.5.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Coomassie-Blau-Färbung wurde sowohl bei SDS-Gelen - in denen dabei gleichzeitig die Proteine durch Fällung fixiert wurden - als auch bei auf Membranen geblotteten Proteingelen (s. Kap. 2.7.3) eingesetzt. Um die Proteine zu fixieren und im Gel bzw. auf der Membran sichtbar zu machen, wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Grenzwerte für die Empfindlichkeit liegen zwischen 200 und 400 ng Protein pro Bande. Die SDS-Gele wurden 1 h in der Färbelösung gefärbt, anschließend zuerst in Entfärber I für 30 min und danach in Entfärber II 2 bis 3 h wieder entfärbt.

Die PVDF-Membranen wurden nur 5 min gefärbt und für 5 bis 10 min in Entfärber gelegt. Nach kurzem Spülen mit Wasser konnten die Membranen an der Luft getrocknet werden.

Lösungen für Coomassie-Färbung:

	<b>Färbelsg (SDS-Gele)</b>	<b>Färbelsg. (Blotmembranen)</b>	<b>Entfärber I</b>	<b>Entfärber II</b>
Coomassie blue R-250 (1 %ige Lsg. in H <sub>2</sub> O)	25 ml	20 ml	-	-
Methanol	100 ml	100 ml	100 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	-	20 ml	14 ml
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml

### 2.7.5.2 Indian-Ink-Färbung von Blotmembranen

Wurde eine höhere Sensitivität als bei der Coomassie-Blau-Färbung benötigt, wurden die Blot-Membranen mit Indian-Ink nach einer Methode von Hancock und Tsang (1983) modifiziert nach Ober (1997) gefärbt. Hierbei konnten noch bis 10 ng BSA gut sichtbar nachgewiesen werden. Die Membranen wurden mit PBS (mit 0,1 % Tween 20) kurz gespült und anschließend mindestens 1 h in der Färbelösung gefärbt. Entfärbt wurde einige Minuten in H<sub>2</sub>O.

**Färbelösung**

PBS (s. Kap 2.8.3)	100 ml
mit 0,1 % (v/v) Tween 20	
Eisessig	1 ml
Fount India-Tinte (Pelikan)	100 µl

**2.7.5.3 Amidoschwarz-Färbung von Blotmembranen**

Nach kurzem Spülen der Membran mit H<sub>2</sub>O, wurde etwa 5 min mit einer 0,1%igen Amidoschwarz-Lösung in Methanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O (40:10:50 v/v/v) gefärbt. Entfärbt wurde in einem Methanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O-Gemisch (25:10:65 v/v/v) für 10 bis 15 min bevor die Membran an der Luft getrocknet wurde. Da der Hintergrund sich nicht vollständig entfärbt, ist die Methode weniger empfindlich als die Indian-Ink-Färbung, erfordert dafür aber weniger Zeit.

**2.7.6 Umpuffern, Fällen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen**

Sowohl für die Elektrophoresen bzw. Western-Blots als auch für die Protein- und Antikörperaufreinigung (s. Kap. 2.8.2 und 2.8.3) war es z.T. notwendig, die Proteinproben umzupuffern oder aufzukonzentrieren. Zum Aufkonzentrieren von Volumina zwischen 3,5 und 15 ml wurden Konzentratoren (Macrosep 30 bzw. Microsep 30, Pall Filtron) mit einer Ausschlußgrenze von 30 kDa oder bei größeren Volumina (bis 50 ml) eine Rührzelle (Amicon) mit einer Ultrafiltrationsmembran (PM 30, Amicon) verwendet.

Zum Entsalzen konnten entweder die Konzentratoren oder aber PD-10 Säulen (Pharmacia) eingesetzt werden. Die PD-10 Säulen wurden mit 25 ml Puffer äquilibriert, anschließend 2,5 ml Probe aufgetragen und mit 3,5 ml Puffer eluiert.

Für die Elektrophorese wurden in starker Verdünnung vorliegende Proteinproben gefällt und in einem geringeren Puffervolumen wieder resuspendiert. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 0,1 % (w/v) Desoxycholat (DOC) in 0,02 % Natriumazid und mit nochmals 1/10 Volumen 55% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Nach kurzem Mischen wurde die Probe 10 min (Volumina bis 100 µl) oder aber über Nacht (bis 1 ml Probenvolumen) bei 4°C gefällt und anschließend 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert

(Sigma 1K15). Das gefällte Protein wurde in gleichen Teilen 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) und Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen.

## 2.8 Immunologische Methoden

### 2.8.1 Immunisierung

Die Immunisierung der Kaninchen mit der DHS aus *S. vernalis* bzw. *N. tabacum* wurde von der Firma Bioscience (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurde gereinigtes und gefriergetrocknetes Protein verwendet. Für die Antikörperherstellung gegen die DHS aus *N. tabacum* erfolgte die erste Injektion mit 500 µg Protein, die zweite und dritte mit jeweils 250 µg. Bei der DHS aus *S. vernalis* betrugen die Proteinkonzentrationen 315 µg sowie zweimal 158 µg. Für die Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis* konnte auf schon vorhandenes Serum zurückgegriffen werden, das von Dietrich Ober hergestellt wurde. Vor der Immunisierung wurde ein Präimmunserum und nach jeder Blutentnahme ein Testaliquot erhalten, um mögliche Kreuzreaktionen untersuchen zu können bzw. den Antikörpertiter zu bestimmen.

#### Standard-Immunisierungsschema (2 Monate)

Tag

0	1. Injektion
21	2. Injektion
35	1. Blutabnahme (2 ml + 15 ml)
49	3. Injektion
53	2. Blutabnahme (2 ml + 20 ml)
60	Entblutung (mind. 50 ml)

### 2.8.2 Reinigung der HSS

Zur Gewinnung spezifischer polyklonaler Antikörper gegen die rekombinante HSS aus *S. vernalis* wurde die HSS in einem dreistufigen Reinigungsschema aufgereinigt, um sie anschließend für eine Affinitätschromatographie einsetzen zu können.

### 2.8.2.1 Anzucht des HSS-exprimierenden *E.coli*-Stammes

Für die Anzucht des transformierten *E.coli*-Stammes, in den die cDNA für die HSS aus *S. vernalis* kloniert worden war (Ober, 1997), wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. 5 ml LB Medium (s. Kap. 2.3.4) wurden mit 10 µl Ampicillin (50 mg/ml) und 50 µl Dauerkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte über 8 h bei 37°C/250 rpm. Für die Hauptkultur wurden 50 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µl Ampicillin (50 mg/ml), mit 200 µl Vorkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Nach Zugabe von 10 ml LB-Medium und einstündiger Inkubation erfolgte über 3 h die Induktion der T<sub>7</sub>-RNA Polymerase mit 48 µl IPTG (0,5 M). Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 rpm (G6-SR-Zentrifuge, Beckman).

### 2.8.2.2 Zellaufschluß

Das Pellet der geernteten Zellen wurde in etwa 5 ml spermidinhaltigem Puffer (Puffer A, s. Kap. 2.8.2.6) pro 50 ml Kultur resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Standard Mikrotipspitze, Pulsiereinrichtung 50 %) für 10 min aufgeschlossen. Zelltrümmer bzw. nicht zerstörte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 27000 x g (SS34-Rotor, Sorvall RC-5B) abgetrennt. Der Überstand wurde direkt zur chromatographischen Aufreinigung der HSS weiterverwendet.

### 2.8.2.3 DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Die Reinigung der rekombinanten HSS aus dem *E.coli* Rohextrakt erfolgte nach einem Protokoll von Ober (1997). Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4°C mit Hilfe des automatisierten Biologic Systems der Firma BioRad durchgeführt. Die Anlage bestand aus einem Controller, über den eine Workstation bestehend aus Pumpen, UV- und Leitfähigkeitsdetektor sowie einem Ventil und Fraktionssammler (Model 2128) angesteuert werden konnte. Die anfallenden Daten konnten mit Hilfe des Controllers dokumentiert werden. Alle mit dieser Anlage verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch etwa 10 min mit Helium entlüftet. Die DEAE-Säule (Fractogel EMD DEAE-650 (M), Merck) mit einem Volumen von 39 ml wurde zunächst mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer D (Flußrate 2,5 ml/min) äquilibriert. Der Überstand aus dem

Zellaufschluß wurde mit der gleichen Flußrate aufgepumpt. Anschließend wurde solange Puffer D über die Säule gepumpt bis die UV-Absorption wieder die Basislinie erreicht hatte. Für die Elution wurde folgender Gradient verwendet: 160 ml Puffer D von 100 % auf 80 % und Puffer D + 1 M NaCl von 0 % auf 20 %, über 70 ml Gradienten halten; 40 ml Puffer D + 1 M NaCl von 20 % auf 100 % und Puffer D von 80 % auf 20 %; 25 ml Puffer D + 1 M NaCl bei einem gleichbleibenden Flußrate von 2,5 ml/min.

#### 2.8.2.4 Bestimmung der HSS-Aktivität

Um die Fraktionen mit HSS-Aktivität zu identifizieren, wurde ein HSS-Aktivitätstest mit Puffer A (s. Kap. 2.8.2.6) nach Ober (1997) durchgeführt. Zur Stabilisierung des Enzyms enthielt der Puffer bereits die Substrate Spermidin und  $\text{NAD}^+$ , so daß auf eine Zugabe im Inkubationsansatz verzichtet werden konnte.

Enzymprobe	10,5 µl
$^{12}\text{C}$ -Putrescin (0,625 mM)	1 µl
<u>[1,4-<math>^{14}\text{C}</math> Putrescin] (92 µM, 0,01 µCi/µl)</u>	<u>1 µl</u>
	12,5 µl

Die Inkubation erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 30 min bei 37°C im Thermoblock. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Ansatz auf eine DC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Fertigplatten, Schichtdicke 0,25 mm, Merck) pipettiert wurde. Die Trennung der Polyamine auf den DC-Platten erfolgte mit einem Fließmittel nach Toppel (1987):

Aceton	40 ml
Methanol	30 ml
NH <sub>3</sub> (25 %)	20 ml

Für die Auswertung wurde ein Rapid Intelligence TLC Analyzer System der Firma Raytest verwendet, der die Quantifizierung von radioaktiv markiertem Substrat und Produkt erlaubte. Als Zählgas für das Geiger-Müller-Zählrohr diente ein Argon-Methangemisch (90:10, Firma Linde).

### 2.8.2.5 Phenylsepharose

Die Säule mit einem Volumen von 190 ml (Phenylsepharose CL-4B, Pharmacia) wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer B äquilibriert. Die vereinigten Fraktionen aus der DEAE-Chromatographie, die HSS-Aktivität aufwiesen, wurden auf eine NaCl-Konzentration von 1,5 M eingestellt und mit einer Flußrate von 2,5 ml/min auf die Säule gepumpt. Die Elution erfolgte mit abnehmender NaCl-Konzentration: 90 ml Puffer B (NaCl) von 100 % auf 60 % und Puffer D (ohne Spermidin) von 0 % auf 40 %; 800 ml Puffer B (NaCl) von 60 % auf 0 % und Puffer D von 40 % auf 100 %; 400 ml Puffer D: Die Flußrate betrug 2,5 ml/min. Die Fraktionen, die HSS-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt.

### 2.8.2.6 Spermidin-Sepharose

Für die Reinigung über Affinitätschromatographie wurde aktivierte CH-Sepharose 4B (Pharmacia) verwendet, an die Spermidin nach Herstellervorschrift gekoppelt worden war (Ober, 1997). Die Äquilibration der Säule, die ein Volumen von 13 ml hatte, erfolgte mit 50 ml Puffer C bei einer Flußrate von 2 ml/min. Die aus der Phenylsepharose-Chromatographie stammenden vereinigten Fraktionen mit HSS-Aktivität wurden in einer Amicon-Rührzelle auf 17 ml aufkonzentriert und mit Hilfe eines Superloops (Pharmacia) mit einer Flußrate von 0,2 ml/min aufgetragen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit Puffer C + 0,2 M NaCl gespült. Eluiert wurde die HSS mit Puffer C + 100 mM Spermidin.

Um die Reinheit des Proteins nach den einzelnen Reinigungsschritten zu überprüfen, wurde ein Aliquot der vereinigten Fraktionen aus den verschiedenen Chromatographien in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt.

Folgende Puffer wurden für die Reinigung der HSS verwendet:

	<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>	<b>Puffer C</b>	<b>Puffer D</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	50 mM	25 mM	5 mM
DTE	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
NAD <sup>+</sup>	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
Spermidin	0,5 mM	0,5 mM -	-	0,5 mM
EDTA (Na-Salz)	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
NaCl	-	1,5 M	-	-
pH-Wert	8,7	8,7	8,7	8,7

### 2.8.3 Affinitätsreinigung der Antikörper

#### 2.8.3.1 HSS-Affinitätschromatographie

Die gereinigte HSS wurde zur Reinigung der Antikörper wie folgt an aktivierte CH-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt. 0,5 mg Protein wurden mit PD-10 Säulen auf den Kopplungspuffer umgepuffert. 1 g Gelmaterial wurde der Herstellervorschrift entsprechend in 1 mM HCl gequollen, gewaschen und anschließend in Kopplungspuffer äquilibriert.

Die Kopplung mit dem Protein erfolgte 2 h bei Raumtemperatur in einem end-over-end-Schüttler. Anschließend wurde die Sepharose zuerst mit Kopplungspuffer gewaschen bis die OD<sub>280</sub> der Waschlösung bei etwa 0,2 lag. Noch freie Bindungsstellen der aktivierten Sepharose wurden 1 h bei Raumtemperatur im end-over-end-Schüttler abgesättigt indem dreimal im Wechsel mit Blockpuffer und danach mit Waschpuffer gewaschen wurde. Zum Schluß wurde die Sepharose in PBS (mit 0,02 % NaN<sub>3</sub>) (s. Kap. 2.8.3) gelagert.

Für die Affinitätsreinigung des DHS-Antikörpers wurde eine etwas vereinfachte Vorgehensweise gewählt. Die die DHS exprimierenden *E.coli* Zellen einer 100 ml LB-Kultur wurden gemäß Kapitel 2.8.2.2 sonifiziert. Der Überstand wurde direkt für eine Kopplung des Proteins an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die CNBr-aktivierte Sepharose hat im Gegensatz zur CH-Sepharose mit 5-10 mg Protein/ml Gel eine mehr als doppelt so hohe Proteinbindungskapazität als CH-Sepharose. Da im Fall der DHS nicht das gereinigte Protein, sondern ein Bakterienlysat an die Matrix gekoppelt wurde, war eine höhere

Bindungskapazität nötig. Die Kopplungsschritte für die CNBr-aktivierte erfolgten mit 3 mg Gesamtprotein pro ml gequollenem Gel analog zu der Kopplung mit CH-Sepharose.

	<b>Kopplungspuffer</b>	<b>Blockpuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M	-	-
NaCl	0,5 M	0,5 M	0,5 M
Tris Base	-	0,1 M	-
Eisessig	-	-	0,1 M
	pH 8,0	pH 8,0	pH 4,0

Das Kaninchenserum (s. Kap. 2.8.1) wurde zuerst über Glaswolle gegeben, die die bei der Reinigung störenden Lipide bindet. Für die Reinigung des polyklonalen HSS-Antikörpers wurden 20 ml Kaninchenserum (Hauptserum von 1996/97) zu dem mit PBS gewaschenen Säulenmaterial gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht im end-over-end Schüttler bei Raumtemperatur. Nach Abnahme des überschüssigen Serums wurde dreimal mit 20 ml PBS gewaschen. Das Säulenmaterial wurde in leere PD10-Hülsen gefüllt und zur Elution unspezifisch gebundener Antikörper mit Puffer 1 gespült bis die OD<sub>280</sub> bei einem Wert von etwa 0,03 lag. Die Elution erfolgte mit Puffer 2 zu Fraktionen von 1 ml, bei denen zuvor je 100 µl 1,5 M Tris/HCl Puffer pH 8 zum Gegenpuffern vorgelegt worden waren, damit die Antikörper durch den sauren pH des Elutionspuffer nicht denaturierten. Die einzelnen Fraktionen wurden ebenfalls bei 280 nm photometrisch vermessen und diejenigen mit einer OD über 0,1 vereinigt. Mit Macrosep 30 K (Ausschlußgrenze 30 kDa, Pall Filtron) wurden die gepoolten Fraktionen auf eine OD<sub>280</sub> von mehr als 0,8 (bzw. 1,86 für den DHS-Antikörper) konzentriert. Dieses Antikörperkonzentrat wurde mit NaN<sub>3</sub> (Endkonzentration 0,02 %) versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle immunologischen Versuche mit der HSS und DHS wurden mit diesen Antikörpern durchgeführt. Die Spezifität der so gereinigten Antikörper wurde mit Hilfe von Western-Blots (s. Kap. 2.7.3) überprüft, der zur Prüfung auf Kreuzreaktivität den leeren Vektor und Protein von Klon A und B in Konzentrationen von 2,5 ng, 10 ng, 50 ng und 250 ng beinhaltete.

Um eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern gegen die HSS bzw. DHS auszuschließen, wurden die Antikörper "kreuzgereinigt". Hierfür wurde affinitätsgereinigter HSS-Antikörper über die Affinitätssäule für den DHS-Antikörper (an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelte DHS) gegeben. Anschließend wurde der



Durchlauf weiterverwendet, der nur für die HSS spezifische Antikörper enthalten sollte. Für eine "Kreuzreinigung" des DHS-Antikörpers wurde genau umgekehrt verfahren.

<b>Puffer 1</b>		<b>Puffer 2</b>	
Na-Acetat	0,1 M	Na-Acetat	0,1 M
NaCl	0,5 M	NaCl	0,5 M
pH 4,5		pH 2,7	

## 2.9 Gewebefixierung und Schnitte

### 2.9.1 Gewebefixierung Einbettung

#### 2.9.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Um eine Fixierung der Zellinhalte und der Antigene zu gewährleisten, wurden die Gewebe mit Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert. Beide Reagenzien bewirken eine Quervernetzung von Proteinen und wurden in Konzentrationen von 1 % bis 4% (Formaldehyd) bzw. 0,2 % bis 2,5 % (Glutaraldehyd) in 0,05 M Phosphatpuffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) verwendet. Das Formaldehyd wurde wie folgt für die Fixierungen frisch hergestellt und innerhalb von einem Monat verbraucht: 4 g Paraformaldehyd wurden in 40 ml Aqua bidest. auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde 10 N NaOH zugeben bis sich die Lösung klärte. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden 10 ml 10 x PBS dazugegeben der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt. Gelagert wurde die Lösung bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln.

Damit eine Fixierung in allen Gewebeteilen erfolgen konnte, wurde mit dem Fixativ 1 h unter Vakuum infiltriert (Gefriertrocknung: Alpha 1050, Christ). Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssigem Fixierer zweimal 10 min mit Phosphatpuffer gewaschen. Damit das später zur Einbettung verwendete Harz in alle Gewebebereiche vollständig eindringen konnte, wurde zunächst mit einer Ethanolreihe (10, 30, 50, 70, 90 % in  $\text{H}_2\text{O}$  dreimal 100 % Ethanol, je 30 min mit Vakuuminfiltration) entwässert.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die fixierten und entwässerten Gewebe in einen Kunststoff (Technovit 7100, Heraeus-Kulzer) eingebettet. Die Präinfiltration erfolgte mit einem Gemisch aus gleichen Teilen von Technovit 7100 + Ethanol (100%) für 30 min. Anschließend wurde zuerst mit Technovit 7100 für 30 min infiltriert und danach mit Technovit 7100 + Härter I (1g Härter I/100 ml Technovit 7100)

für 3-4 h oder über Nacht. Zum Schluß wurden die Gewebe zusammen mit Technovit 7100 sowie Härter I und II in Förmchen gegossen und die Gewebe ausgerichtet. Während die bisherigen Arbeitsschritte bei RT erfolgten, wurden die Gewebe auf Eis ausgerichtet, um ein vorzeitiges Auspolymerisieren zu vermeiden. Die Polymerisation erfolgte dann wieder bei Raumtemperatur. Bei empfindlichen Antigenen kann die Polymerisation ebenfalls bei 4°C erfolgen, um ein zu starkes Erwärmen der Proben zu verhindern. Für ein vollständiges Auspolymerisieren wurden die Proben mit Technovit 3040 nach Vorschrift des Herstellers aufgeblockt. Als Förmchen dienten entweder für größere Gewebe eine Teflonform oder für kleinere Gewebe wie z.B. Wurzelteile, PCR-Tubes.

Um die Kunststoffblöckchen mit einem Rotationsmikrotom gut schneiden zu können, wurden die sie mit einer Rasierklinge unter der Stereolupe in Pyramidenform getrimmt. Geschnitten wurden die Blöckchen mit einem Rotationsmikrotom (Micron H355) in das Metallmesser (Edge-Rite™, Low Profile Microtome Blades, Richard Allan Scientific) eingelegt werden konnten. Sollten mit Unicryl eingebettete Gewebe geschnitten werden, wurden aufgrund des spröden Materials Glasmesser verwendet, die zuvor selbst gebrochen wurden. Die Schnittdicke betrug zwischen 3 und 5 µm. Danach wurden die Schnitte auf Teflon beschichtete Objektträger (Roth) aufgezogen. Die Haftung der Kunststoffschnitte wurde auch auf mit Polylysin beschichteten Objektträgern und Superfrost-Objektträgern (beide von Menzel) getestet.

#### 2.9.1.2 Einbettung in Paraffin

Als Alternative wurde eine Einbettung mit Paraffin (Schmelzpunkt 58-60°C) durchgeführt wie sie auch für *in-situ* Hybridisierungen üblich ist. Die Proben wurden hierfür mit FAA (50 % Ethanol, 5 % Eisessig, 3,7 % Formaldehyd) fixiert. Die Fixierzeit richtete sich nach der Größe der zu fixierenden Gewebe und betrug 1 bis 2 Stunden. Danach erfolgte eine stufenweise Dehydrierung mit einer tertiär-Butanol-Reihe:

	Entwässerungsgrad					
	50%	70 %	85 %	95 %	100 %	pur
H <sub>2</sub> O	50	30	15	-	-	-
Ethanol (95 %)	40	50	50	45	-	-
tert. Butanol	10	20	35	55	75	100
Ethanol (abs.)	-	-	-	-	25	-

In jeder Lösung verblieb das Gewebe für je 1 h. Nach der Inkubation des Gewebes in reinem tert. Butanol für nochmals 1 h bei RT, wurde das tertiär-Butanol schrittweise durch Paraffin ersetzt. Zunächst wurde 4 h in gleichen Volumenanteilen von Paraffin und tert. Butanol bei 60°C inkubiert. Diese Mischung wurde nochmals erneuert und noch einmal bei 60°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe in reinem Paraffin über Nacht inkubiert und dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Danach konnte die Positionierung in einer Teflonform oder PCR-Gefäßen erfolgen.

Um die Einbettung zu optimieren, erfolgte in einer weiteren Methode nach der Fixierung eine Entwässerung mit Ethanol in Wasser (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, zweimal 100 %). Anschließend folgte eine aufsteigende Reihe (30 %, 60 %, 75 % zweimal 100 %) mit einem Xylolersatzstoff (Histoclear, Vogel) gemischt mit Ethanol. Sowohl bei der Entwässerung als auch bei der aufsteigenden Reihe mit Histoclear verblieben die Gewebe in jeder Lösung für 0,5 h. Dann wurde auf 60°C erhitzt und Paraffin bis zur Sättigung zugegeben. Zum Schluß wurden die Gewebe nochmal in 100 % Paraffin überführt und dieser Schritt wiederholt. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf 40°C warmem Wasser gestreckt und es erfolgte eine Fixierung der Schnitte auf Polylysin beschichteten Objektträgern durch Aufbacken bei 40°C für 30 min oder über Nacht.

### 2.9.1.3 Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Sollten Gewebe für die Elektronenmikroskopie präpariert werden, wurden sie wie folgt in Unicryl (Plano) nach vorhergehender Fixierung und Entwässerung (s. Kap. 2.9.1.1) eingebettet. Die Infiltration des Einbettungsmittels erfolgte stufenweise je 30 min in einem 1:3- und 3:1-Gemisch des Harzes in Ethanol sowie 2 mal 1 h in 100 % Harz. Die Gewebe wurden nochmals in frischem Harz getränkt, bevor sie über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Polymerisation erfolgte bei 55°C über 1-2 Tage in PCR-Tubes.

Um Membranen sichtbar zu machen, erfolgte eine Sekundärfixierung der Gewebe mit Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ), die aber gleichzeitig auch zum Verlust der Antigenität führt und sich damit nicht mehr für eine Immunogoldmarkierung eignet. Osmiumtetroxid greift hauptsächlich Lipide und andere Moleküle an ungesättigten Verbindungen an und vernetzt sie. Es scheint ebenfalls an Strukturen zu binden, die mit Aldehyden fixiert wurden. Außerdem streut es effektiv Elektronen, so daß es den Probenkontrast stark

erhöht (Flegler et al., 1995). Für die Fixierung wurden die Gewebe zunächst entsprechend der Unicryl-Einbettung (s. Kap. 2.9.1) fixiert. Da es hierbei nicht auf einen Erhalt der Antigenität ankam, wurde die Glutaraldehydkonzentration auf 2,5 % erhöht, um eine bessere Quervernetzung zu erreichen. Danach wurden die Gewebe kurz mit Phosphatpuffer gewaschen und für 0,5 bzw. 2 h in einer 2 %igen Osmiumtetroxidlösung (Roth) unter dem Abzug inkubiert. Die folgenden Einbettungsschritte erfolgten wieder entsprechend der Vorschrift für Unicryl.

Um Gewebeschnitte im Elektronenmikroskop auch bei geringerer Vergrößerung betrachten zu können, müssen Grids mit einer größeren Maschenweite (100 mesh, Plano) verwendet werden, bei denen die Stege des Gitters einen größeren Abstand zueinander haben. Hierfür ist eine Einbettung in einen Phthalsäure-dibutylester (Araldit M, Fluka) nötig. Dieser Kunststoff weist eine höhere Stabilität als Unicryl auf. Nach erfolgter Fixierung und Entwässerung (s. Kap. 2.9.1.1), findet eine zweite Entwässerung des Gewebes mit Hilfe von Propylenoxid statt. Hierdurch wird das Wasser vollständig entfernt, was zu einer Stabilisierung des Gewebes beiträgt.

Die Infiltration mit Propylenoxid bzw. Araldit erfolgte nach folgendem Schema (s. Tab. 2.5):

	Ethanol	Propylenoxid	Araldit	Inkubationszeit
1.	50 %	50 %	-	15 min
2.	-	100 %	-	15 min
3.	-	100 %	-	15 min
4.	-	100 %	-	15 min
5.	-	80 %	20 %	2 h
6.	-	50 %	50 %	2 h
7.	-	33,3%	66,6 %	2 h
8.	-	20 %	80 %	12 h
9.	-	-	100 %	5 h

**Tab. 2.5:** Infiltrationsschema für Aralditeinbettung

Für die Einbettung in Araldit wurden die Gewebe in Flachbettgießformen aus Silikonkautschuk (Roth) ausgerichtet und 48 h bei 60 °C im Trockenschrank gehärtet.

## 2.9.2 Immunomarkierung von Gewebeschnitten

### 2.9.2.1 Immunogoldmarkierung und silver-enhancement

Um unspezifische Bindungen zu blocken und zu verhindern, daß noch eventuell vorhandenes freies Formaldehyd oder Glutaraldehyd die Antikörper quervernetzen konnte, wurden die Schnitte auf den Objektträgern zuerst 15 min mit einer 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung, danach mit einer 0,15 M Glycinlösung und schließlich mit 10 % (w/v) BSA/0,1 % (v/v) Fischgelatine in PBS für jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem dreimal 1 min mit PBS gespült worden war, wurde mit dem primären Antikörper (1:100 oder 1:500 Verdünnung des polyklonalen Antikörpers gegen die HSS,  $\text{OD}_{280} = 0,88$ ) 1h in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die feuchte Kammer erlaubt längere Inkubationen, ohne ein Austrocknen der Lösungen auf dem Schnitt befürchten zu müssen. Anschließend wurde fünfmal 1 min mit PBS gespült und 1 h mit dem sekundären Antikörper (Goat anti Rabbit 18 nm Gold, Dianova, 1:20 verdünnt) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (dreimal 1 min mit PBS), wurden je 10 µl der Lösungen A und B aus dem Silver-enhancement-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellervorschrift gemischt und sofort auf den Schnitt geben. Nach 10 bis 15 min

war unter dem Lichtmikroskop eine Schwärzung des Gewebes zu erkennen, und die Reaktion wurde durch Spülen mit Aqua dest. gestoppt. Betrachtet wurden die Schnitte mit dem Lichtmikroskop (Zeiss III Photomikroskop) in 200facher und 500facher Vergrößerung und mit dem gleichen Mikroskop auch dokumentiert. Sowohl für die Immunogold- als auch für die FITC-Markierung wurden die Schnitte mit Präimmun- und Hauptserum jeweils in den Konzentrationen unverdünnt, 1:50 1:100 und 1:200 als Kontrollen inkubiert.

#### 2.9.2.2 Fluoreszenzmarkierung

Die Markierung erfolgte entsprechend der Methode für den Goldantikörper (s. Kap. 2.9.2.1), jedoch wurde hier ein Goat anti Rabbit Antikörper konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sigma) verwendet. Die mit dem FITC-Antikörper (Verdünnung: 1:100 mit PBS-Puffer) markierten Gewebeschnitte wurden mit einem UV-Auflichtmikroskop (Zeiss III Photomikroskop: RS Filter: 450-490 nm, Ft 520 nm LP 530 nm) betrachtet. Um Kreuzreaktionen zwischen dem HSS-Antikörper und dem DHS-Protein auszuschließen, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde vor der Inkubation mit dem *S. vernalis* Wurzelquerschnitt für 10 min mit zwei verschiedenen HSS-Proteinkonzentrationen vorinkubiert. Die eine Proteinkonzentration entsprach der dreifachen IgG-Konzentration, die andere betrug nur ein Zehntel. Mit dem DHS Protein wurde ebenso verfahren. Die folgenden Markierungsschritte erfolgten wie bereits beschrieben (s. Kap. 2.9.2.1).

#### 2.9.2.3 Befilmen von Nickelgrids

Für die Elektronenmikroskopie wurden die nur etwa 80 nm dünnen Schnitte auf einen Metallträger (Nickelgrids, 300 mesh; Plano) aufgebracht. Die Grids mußten dafür zunächst mit einem Polyvenylbutyral-Harz (Butvar B-98, Sigma) beschichtet werden. Der Kunststoff wurde als 2%ige Lösung in Chloroform auf einen Objektträger aufgezogen. Hierfür wurde ein Scheidetrichter (250 ml, NS29/32) mit etwa 50 ml der Butvarlösung gefüllt, der Objektträger hineingehängt und die Lösung durch den Hahn abgelassen, so daß ein gleichmäßiger Film auf dem Objektträger entstand. Die Objektträger wurden 15 min bei RT getrocknet und anschließend der Kunststoffilm an den Kanten des Objektträgers angeritzt. Um den Kunststoffilm abzulösen, wurde der

Objektträger schräg in ein Gefäß mit destilliertem Wasser eingetaucht, bis der Film auf der Wasseroberfläche flottierte. Die Grids wurden dann mit der matten Seite auf den Kunststoff gelegt. Mit der rauhen Seite des Trennblattes eines Parafilmstreifens wurden die beschichteten Grids von der Oberfläche abgenommen und in einer Petrischale getrocknet.

#### 2.9.2.4 Immunogoldmarkierung für Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Für die Transmissionselektronen-Mikroskopie wurden frische Wurzeln von *S. vernalis* in Unicryl eingebettet (s. Kap. 2.9.1). Die fertigen Kunststoffblöckchen wurden vor dem Schneiden unter dem Binokular zu einer Pyramide mit einer trapezförmigen Grundfläche getrimmt. Anschließend wurden Schnitte, die eine Stärke von etwa 80 nm hatten, mit einem Glasmesser an einem Ultramikrotom (Ultracut; Reichert-Jung) angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Butvar B98 (Sigma) beschichtete Nickel Grids (300 mesh) (s. Kap. 2.9.2.3) übertragen und für die Markierung zunächst jeweils 5 min mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 50 mM Glycin und schließlich 10 % BSA/0,1 % Fischgelatine geblockt. Hierfür sowie für die folgenden Markierungsschritte wurden die entsprechenden Lösungen auf Parafilm getropft und die Schnitte mit dem Grid über Kopf auf dem Tropfen inkubiert. Die Inkubationen mit dem primären (Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis*) und dem sekundären Antikörper (Goat anti-Rabbit IgG, Gold-Konjugat 18 nm, Dianova) erfolgten entsprechend der Immunogoldmarkierung mit anschließendem Silver-Enhancement (s. Kap. 2.9.2.1). Um eine optimale Markierung zu erreichen, wurden jedoch die Verdünnung des primären Antikörpers sowie die Konzentrationen des BSA in PBS-Puffer, mit dem der primäre Antikörper verdünnt wurde, die Inkubationszeiten und die Temperatur optimiert (s. Tab. 2.6). Da biologisches Material in der Regel einen geringen Elektronenkontrast aufweist, wurden die Schnitte mit einem elektronendichten Kontrastierungsmittel (einer 2 %igen Uranylacetatlösung, Plano) behandelt, bevor sie im TEM (Philips 300 EM) betrachtet wurden. Die Inkubationszeit betrug zwischen 20 und 30 min. Anschließend wurden die Grids nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

	Ni-Grids/Butvar-beschichtet	Ni-Grid (Carbon/ Formvar-beschichtet; Plano)
37°C (3 h)/ 3% BSA in PBS-Puffer	HSS-AK 1:250 verd.  HSS-AK 1: 500 verd. HSS-AK 1:750 verd. HSS-AK 1:1000 verd.	HSS-AK 1:250 verd.  HSS-AK 1: 500 verd. - -
37°C (6h)/ 3% BSA in PBS-Puffer	HSS-AK 1: 500 verd.  PIS 1: 500 verd. HSS-AK 1:750 verd.	-  - -
4°C (O/N)/ 3% BSA in PBS-Puffer	HSS-AK 1:250 verd.  HSS-AK 1: 500 verd. HSS-AK 1:750 verd. HSS-AK 1:1000 verd.	HSS-AK 1:250 verd.  HSS-AK 1: 500 verd. HSS-AK 1:750 verd. HSS-AK 1:1000 verd.
4°C (O/N)/ 1% BSA in PBS-Puffer	HSS-AK 1:50 verd.  HSS-AK 1:100 verd. HSS-AK 1:250 verd.	-  - -

**Tab. 2.6:** Inkubationsschema zur Optimierung der Immunogoldmarkierung für das TEM

### 2.9.3 GUS-Färbung

Für die Analyse der Genexpression bei höheren Pflanzen kann ein Reportersystem mit einer *E. coli*  $\beta$ -Glucuronidase (GUS, EC 3.2.1.31) verwendet werden (Jefferson et al. 1987). Mit Hilfe dieses Systems kann die Expression von Genen, die nur gering exprimiert werden, analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Verwendung des GUS-Systems die Lokalisation der DHS in *N. tabacum* erfolgen. Die transformierten Tabakpflanzen der Sorte Samsun enthielten den DHS Promotor aus *N. tabacum* vor einem Fusionsgen für eine  $\beta$ -Glucuronidase und GFP (green fluorescent protein). Die transformierten Pflanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ober zur



Verfügung gestellt. Bei der GUS handelt es sich um eine Hydrolase, die eine Reihe von  $\beta$ -Glucuroniden, wie hier das künstliche Substrat x-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure), spalten kann, so daß ein blaues Präzipitat entsteht. Für die Lokalisation der DHS wurden Blattscheiben und Wurzelstückchen der transformierten Tabakpflanzen in der GUS-Färbelösung für 4 bis 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4 % Formaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd über 24 h bei RT. Für die Einbettung der Gewebe wurde Technovit 7100 verwendet (s. Kap. 2.9.1).

### GUS-Puffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100mM
EDTA	10 mM
0,1 % Triton X-100	50 $\mu$ l
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5 mM
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5mM
pH 7,5 (mit 5N NaOH eingestellt)	

### X-Glucuronid-Stammlösung

X-Gluc	50 mM
in DMF	
(Die Lagerung der Lösung erfolgte bei -20°C.)	

### GUS-Färbelösung

GUS-Puffer	15 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	7,5 $\mu$ l
X-Gluc Stammlsg.	300 $\mu$ l

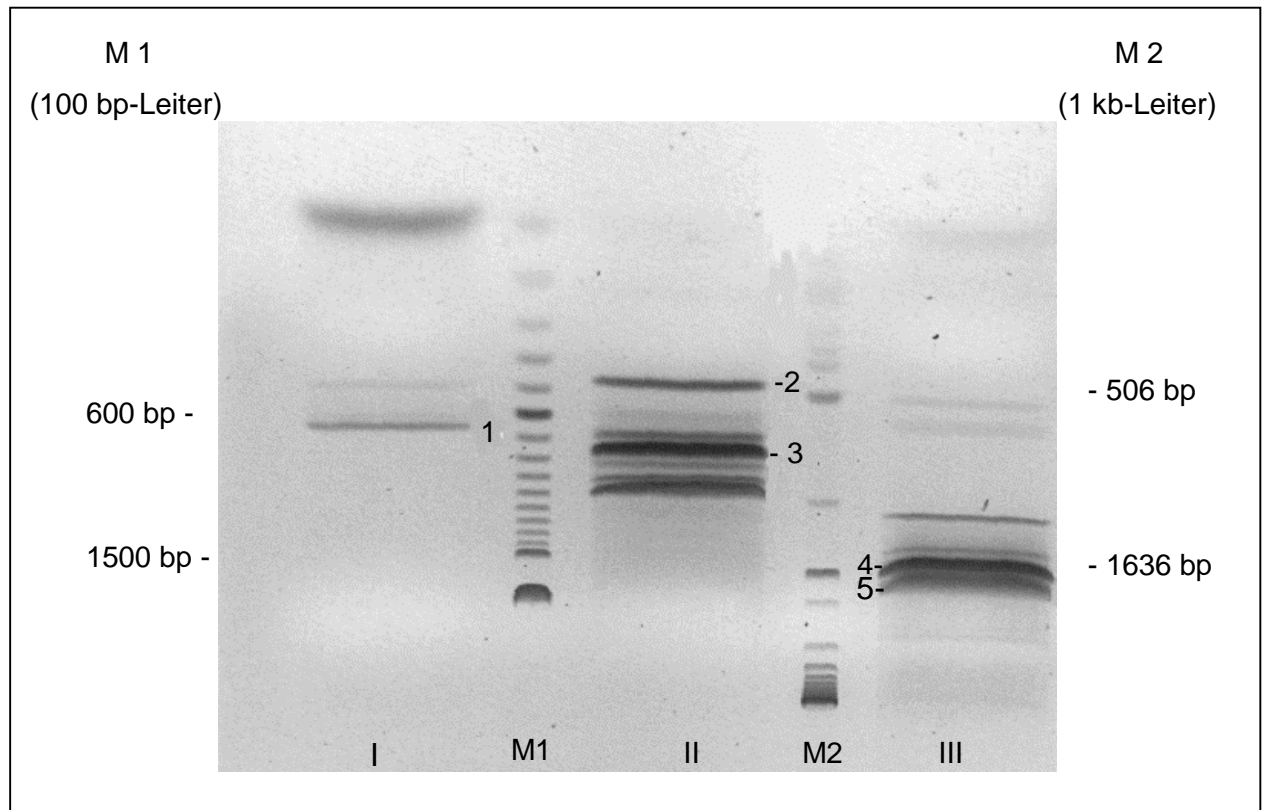
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genomische Organisation von HSS und DHS bei *S. vernalis*

Ziel der Untersuchung der genomischen Organisation von HSS und DHS bei *S. vernalis* war es, die möglicherweise in den Genen enthaltenen Introns zu identifizieren sowie ihre Sequenz und Lage zu vergleichen. Die cDNAs beider Enzyme waren aus früheren Untersuchungen bekannt (Ober & Hartmann, 1999a). Ist die vollständige Sequenz eines Gens bekannt, können im Southern-Blot Aussagen über die Anzahl der Gene bzw. Allele für das jeweilige Enzym getroffen werden. Bei Kenntnis aller potentieller Schnittstellen der verschiedenen im Southern-Blot eingesetzten Endonukleasen ist vorhersagbar, in wieviele Fragmente das Gen zerschnitten wird. Sind mehr Banden als erwartet im Southern-Blot nachweisbar, so spricht dies dafür, daß es im Genom mehr als nur das eine bekannte Gen geben muß.

#### 3.1.1 Amplifikation der genomischen DNA durch PCR

Zunächst wurde mit verschiedenen PCR-Ansätzen, bei der genomische DNA aus einer *S. vernalis* WOK als Template diente, mit unterschiedlichen Kombinationen von full-length Primern (mit ihnen kann die gesamte codierende cDNA eines Gens amplifiziert werden) sowie geninternen Primern (s. Abb. 3.1 und Abb. 3.2) die entsprechenden Fragmente des HSS- bzw. DHS-Gens amplifiziert. Hierfür konnte nur die mit dem DNeasy-Kit (s. Kap. 2.4.2) isolierte DNA als Template eingesetzt werden, da die nach der Methode von Doyle & Doyle (1990) (s. Kap. 2.4.1) hergestellte genomische DNA keine Amplifikate lieferte. Möglicherweise wies die ohne Kit hergestellte genomische DNA nicht die nötige Reinheit auf.



**Abb. 3.1:** PCR mit genomischer DNA aus Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* und folgenden Primerkombinationen für die *hss*, aufgetrennt in einem 1 %igen Agarosegel. Das Probenvolumen der PCR betrug 20 µl:

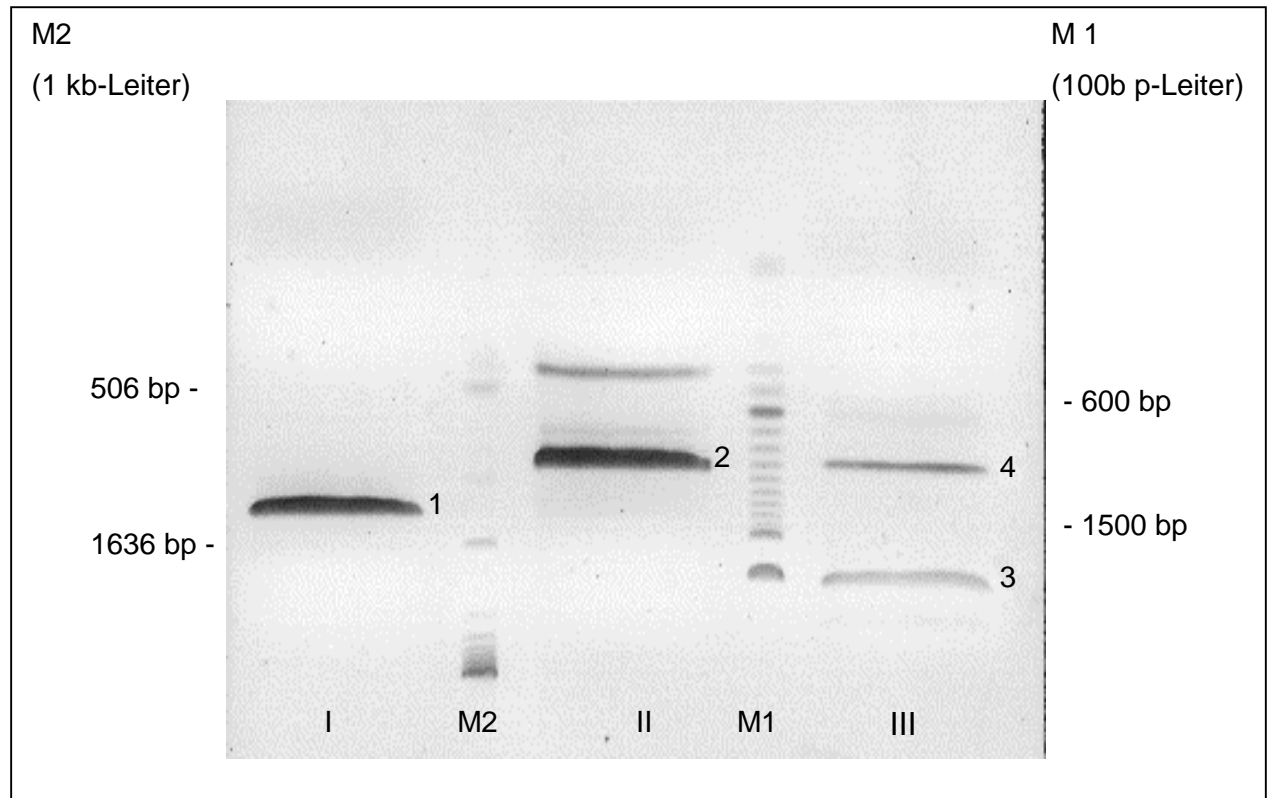
	I	II	III
forward	D4-3 RACE 1 for**	EXP Klon A for*	EXP Klon A for
reverse	EXP Klon A rev	D4-5 RACE 2 rev	EXP Klon A rev
erwartete Fragmente (ohne mögliche Introns)	478 bp	471 bp	1107 bp
isolierte Fragmente	680 bp (1)	480 bp (2) bzw. 780 bp (3)	1500 bp (4) bzw. 1700 bp (5)

M1: 100 bp-Leiter: Die 600 bp Bande ist zweifach stärker konzentriert als die anderen Leiterbanden. Der Größenunterschied zwischen den einzelnen Banden beträgt jeweils 100 bp.

M2: 1 kb-Leiter: Die 1636 bp Bande enthält 10 % der Gesamtkonzentration der Leiter. Direkt oberhalb der 1636 bp Bande liegt eine mit 1018 bp.

\*mit EXP gekennzeichnete Primer wurden ursprünglich zur Amplifikation des gesamten codierenden Bereichs einer cDNA entworfen; Klon A bezeichnet die cDNA der HSS und Klon B die cDNA der DHS aus *S. vernalis*

\*\* mit RACE gekennzeichnete Primer waren ursprünglich für die sogenannte "Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)"-Technik entworfen worden



**Abb. 3.2:** PCR mit genomischer DNA aus Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* und folgenden Primerkombinationen (Erklärung s. Abb. 3.1) für die *dhs*, aufgetrennt in einem 1 %igen Agarosegel. Das Probenvolumen betrug 20 µl:

	I	II	III
forward	D7-3 RACE 1 for	EXP Klon B for	EXP Klon B for*
reverse	EXP Klon B rev	D7-5 RACE 3 rev**	EXP Klon B rev
erwartete Fragmente (ohne mögliche Introns)	636 bp	533 bp	1110 bp
isolierte Fragmente	1300 bp (1)	900 bp (2)	> 2000 bp (3) 900 bp (4)

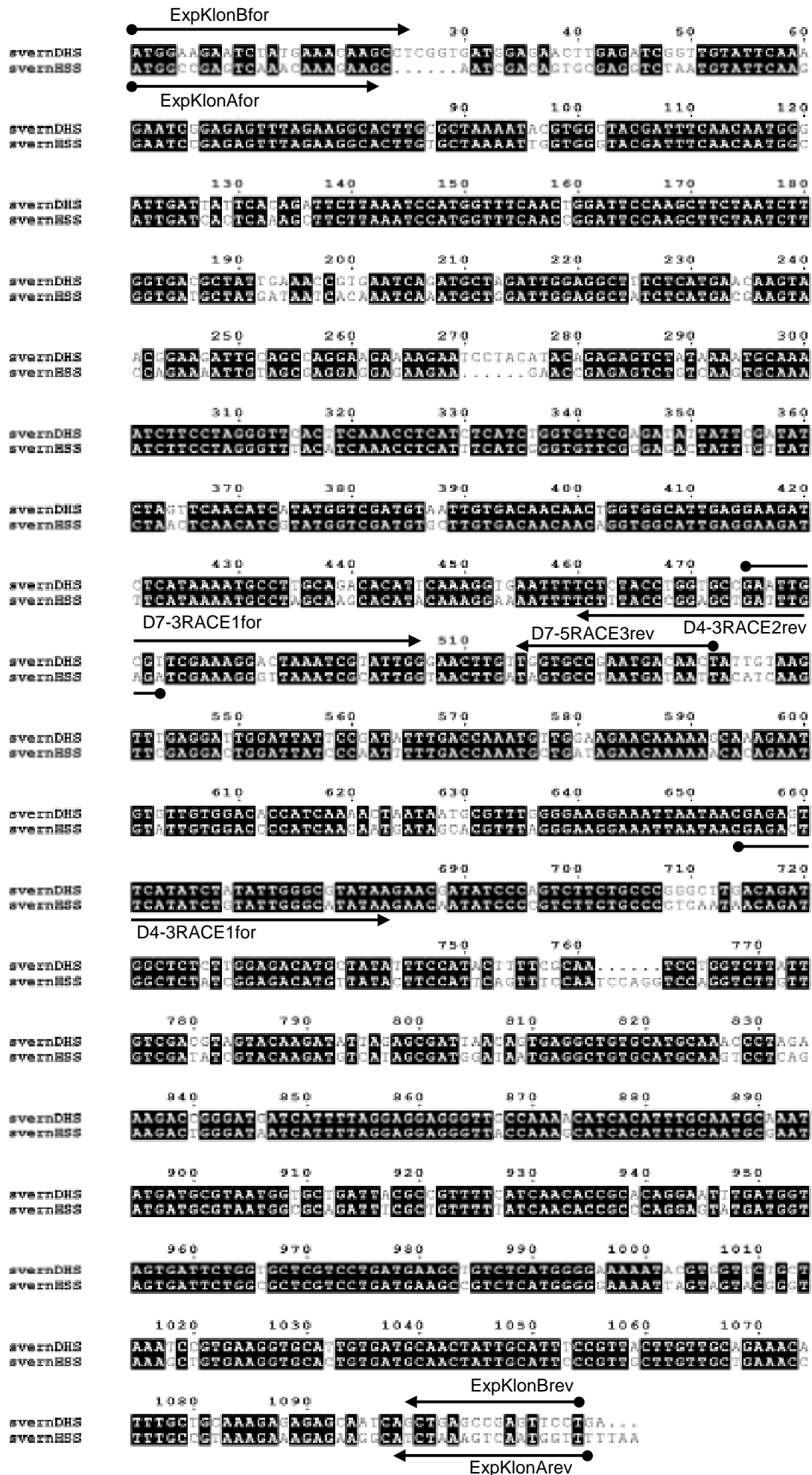
Legende zu den Primern und Markern (M1 und M2) siehe auch Abb. 3.1.

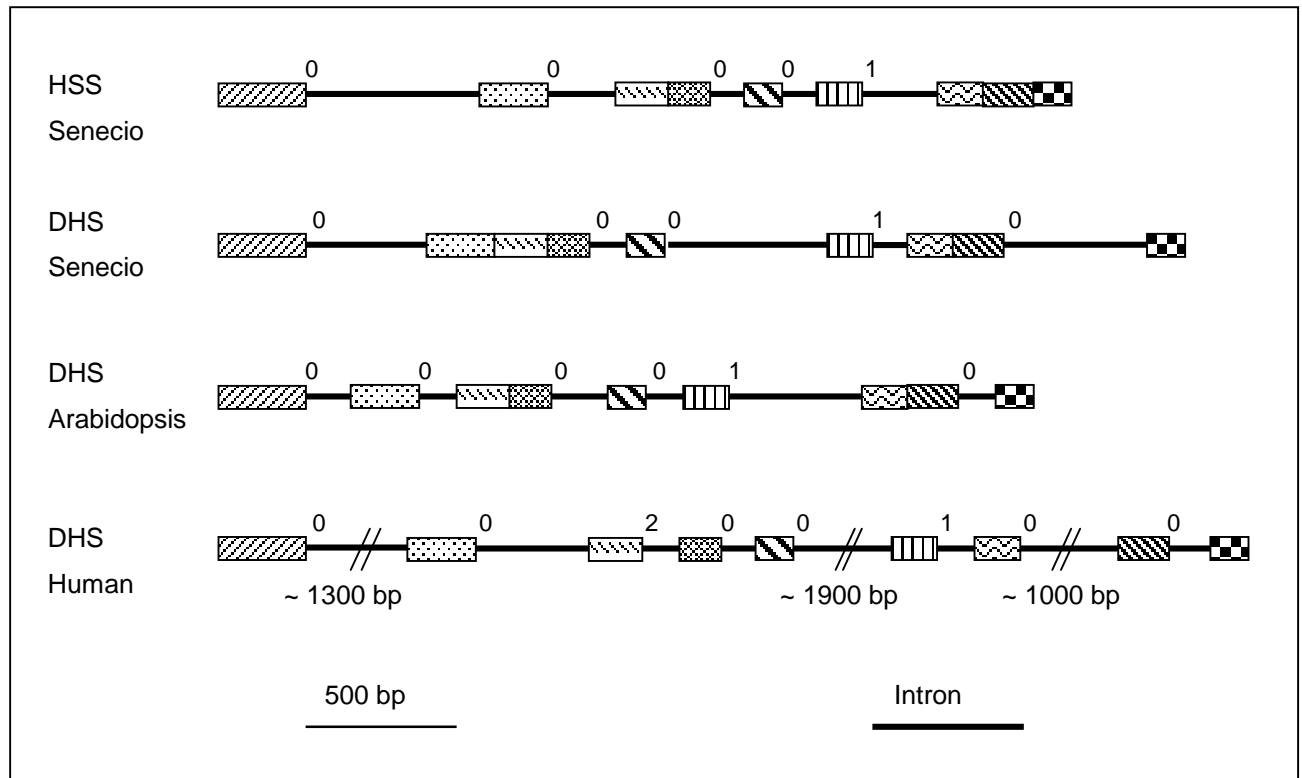
Von den bekannten Sequenzen der cDNAs für die HSS und DHS ausgehend (s. Abb. 3.3), wurde errechnet, wie groß die Amplifikate mit den entsprechenden Primern sein müßten, sofern keine Introns enthalten sind. Bei der genomischen DNA der HSS aus *S. vernalis* wurden bei den PCR-Ansätzen I, II und III Fragmente von 478 bp, 471 bp und 1107 bp erwartet. Die Fragmente (1) bis (5) hatten eine höhere Basenpaarzahl als errechnet worden war (s. Abb. 3.1), so daß hier wahrscheinlich auch nicht codierende Bereiche (Introns) enthalten waren.

Bei der genomischen PCR für die DHS aus *S. vernalis* betrugen die errechneten Fragmentgrößen für die Ansätze I bis III 636 bp, 533 bp bzw. 1110 bp. Die Molekulargewichte der beobachteten Banden für die PCR mit den DHS-spezifischen Primern (s. Abb. 3.2) betrugen: (1) 1300 bp, (2) 900 bp, (3) 2000 bp sowie (4) 900 bp und wiesen folglich eine höhere Basenpaarzahl auf, als errechnet worden war.

Bei den anderen im Agarosegel sichtbaren Banden handelte es sich wahrscheinlich um Amplifikate, die aufgrund unspezifischer Primeranlagerungen an die genomische DNA entstanden sind. Für die Sequenzierung dieser aus den beiden PCR's erhaltenden Fragmente wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert und in XL1 Blue MRF-(Stratagene) oder INV $\alpha$ F'-Zellen (Invitrogen) transformiert. Nach der Transformation wurden die positiven, ein Insert enthaltenden Klone über Blau/Weiß-Selektion ausgewählt, je einer zur Gewinnung der Plasmid-DNA vermehrt und diese DNA anschließend sequenziert.

**Abb. 3.3** (s. folgende Seite): Alignment der Nukleinsäuresäuresequenz von HSS und DHS aus *S. vernalis* (Ober & Hartmann, 1999b). Die identischen Nukleotide sind schwarz unterlegt. Eingezeichnet ist außerdem die Lage der für die genomische PCR verwendeten full-length -und geninternen Primer. Zur Darstellung des mit ClustalW erzeugten Alignments wurde die Esript-Software (<http://www-pgm1.ipbs.fr:8080/Esript/>) verwendet (Gouet, et al, 1999).





**Abb. 3.4:** Vergleich der Exon- und Intronorganisation von HSS- und DHS-Genen unterschiedlicher Organismen. Die homologen Exonbereiche sind durch schraffierte Kästchen gekennzeichnet. Die Zahlen von 0 bis 2 markieren die Intronphasen (Phase 0: Intron zwischen zwei Codons, Phase 1: Unterbrechung des Codons zwischen der ersten und der zweiten Base bzw. bei Phase 2 zwischen der zweiten und der dritten)

Die erhaltenen Teilsequenzen des Gens für die HSS (*hss*) bzw. des Gens für die DHS (*dhs*) wurden mit Hilfe des GCG-Programmpaketes (Wisconsin-Computer Group) zusammengefügt und auf die Lage möglicher Introns analysiert. Das Alignment der genomischen Sequenzen von *hss* und *dhs* aus *S. vernalis* zeigt, daß zwar die Anzahl der Introns sowie die Intronphasen übereinstimmen, nicht aber die Länge und die Sequenz der Introns (s. Abb. 3.4). Die Lage der Introns ist bei der *hss* und der *dhs* aus *S. vernalis* nur z.T. unterschiedlich. Bei der *hss* liegt z.B. zwischen dem zweiten und dem dritten Exon ein Intron, das bei der *dhs* fehlt. Außerdem sind die Introns bei der *dhs* im Durchschnitt länger als bei der *hss* von *S. vernalis*, wodurch sich eine insgesamt längere genomische DNA ergibt. Ein Sequenzvergleich der Introns auf mögliche Ähnlichkeiten hat zu keinerlei Ergebnis geführt. Vergleicht man die *dhs* unterschiedlicher Organismen wie die von *A. thaliana* oder die des Menschen (die Sequenzen resultieren aus den jeweiligen Genomprojekten und können aus den entsprechenden Datenbanken erhalten werden), so stimmt neben der Länge auch die Anzahl der Introns z.T. nicht überein (s. Abb. 3.4). Die *dhs* aus *A. thaliana* und die des

Menschen haben z.B. im Gegensatz zu der *dhs* aus *S. vernalis* sechs bzw. acht Introns anstatt nur fünf. Insgesamt ist jedoch hervorzuheben, daß es acht potentielle Stellen für Introns gibt, die hoch konserviert sind, jedoch nicht alle belegt sein müssen (s. Abb. 3.4). Die Untersuchungen zur Organisation des *hss*- und *dhs*-Gens stützen somit die Beobachtung, daß evolutionär verwandte Enzyme eine ähnliche Organisation haben. Ein Vergleich der genomischen Strukturen von *hss* und *dhs* bestätigt ebenfalls die allgemeine Beobachtung, daß Variationen in der Länge eines Gens primär durch die Länge der Introns bestimmt werden (Lewin, 2000).

Die Sequenz des DHS-Gens enthält in einem Exonbereich ein Stopp-Codon nach 1713 Basenpaaren, das in der entsprechenden cDNA nicht vorkommt. Dabei könnte es sich um einen Lesefehler der Taq-Polymerase handeln, der aber für die Lage von Introns und Exons keine Rolle spielt. Eine andere Möglichkeit wäre, daß es sich hierbei nur um ein "Pseudogen" handelt. Dieses wäre aber in den Exons praktisch identisch zur funktionell charakterisierten cDNA bis seine Funktion im Zuge der Evolution durch das Stopp-Codon im Leserahmen verloren gegangen wäre. Ein Alignment von cDNA und der genomischen Sequenz des DHS-Gens zeigt an fünf Stellen Unterschiede in einer Base, die aber nur in zwei Fällen auch zu einer unterschiedlichen Aminosäure geführt haben.

### 3.1.2 Southern-Blot-Analyse zur Klärung der Anzahl der HSS-Gene

#### 3.1.2.1 Optimierung der Blotdurchführung

Nachdem die Sequenzen der genomischen DNA von HSS und DHS aus *S. vernalis* bekannt waren, sollte mit Hilfe des Southern-Blots ermittelt werden, ob die Gene nur einmal oder mehrmals im Genom von *S. vernalis* vorkommen.

Da es unterschiedliche Methoden für den Transfer von Nukleinsäuren gibt, wurden zunächst zwei Methoden auf ihre Effizienz überprüft. Für den Transfer kann man entweder Kapillar-, Elektro-, Vakuum- oder Überdruckblotting verwenden. Es wurden aufgrund der vorhandenen Ausstattung Vakuum- und Kapillarblot getestet und anschließend die Methode optimiert. Der Vakuumbplot hat den Vorteil, daß relativ kurze Transferzeiten von etwa 1 h und nur wenig Transferpuffer benötigt werden. Es zeigte sich jedoch, daß bei einem geringen Unterdruck von 20 mbar über zwei bis zu 12 Stunden kein ausreichender Transfer erfolgte. Wurde der Unterdruck bei kürzerer Transferzeit (1 h) verstärkt (50 mbar), kollabierte das Agarosegel, so daß die DNA ebenfalls nicht aus dem Gel transferiert werden konnte.



Ein quantitativer Transfer von DNA auf die Nylonmembran wurde reproduzierbar bei einem Kapillarblot erhalten. Wichtig war hierbei, daß die Geldicke für einen quantitativen Transfer nicht mehr als 5 bis 6 mm betrug. Das Filterpapier mußte regelmäßig etwa alle 45 min gewechselt werden, damit das Gel zum einen durch das Gewicht des feuchten Papiers nicht kollabierte und zum anderen eine gute Kapillarkwirkung erzielt wurde. Eine Beschwerung des Filterpapierstapels war in der Regel nicht notwendig. Um dennoch einen gleichmäßigen Andruck des Filterpapiers zu gewährleisten, wurde lediglich eine kleine Glasplatte auf den Filterpapierstapel gelegt. Der Blot konnte entweder über drei bis vier Stunden oder, DNase-freies Arbeiten vorausgesetzt, über Nacht erfolgen. Des weiteren ist die Transfereffizienz von der Größe der Nukleinsäuren abhängig, da die niedermolekularen Bruchstücke schneller aus dem Gel wandern als die höhermolekularen. Auf eine partielle Depurinierung, die eine Aufspaltung der DNA in kürzere Stücke und damit einen schnelleren und effizienteren Transfer ermöglicht, wurde verzichtet, da die Gefahr besteht, daß durch die Depurinierung die Fragmente zu klein werden und somit nicht mehr ausreichend an die Membran binden bzw. keine stabilen Hybride mit der Sonde bilden (Darling & Brickell, 1996). Für den Transfer von Nukleinsäuren waren zwei unterschiedliche Transferpuffer getestet worden. Der eine Puffer wies eine sehr hohe Salzkonzentration (20 x SSC) auf, der andere enthielt nur ein Viertel davon (5 x SSC) sowie zusätzlich noch 10 mM NaOH, was den pH-Wert um 0,8 Einheiten erhöhte. Bezüglich der Transfereffizienz zeigten die beiden Puffer keine Unterschiede. Entscheidend für einen erfolgreichen Transfer waren somit die Geldicke sowie Maßnahmen, um das Kollabieren des Gels zu verhindern.

Für die anschließende Hybridisierung wurden mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden eingesetzt, die gegenüber mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten Sonden ein gefahrloseres Arbeiten ermöglichen. Bei der Herstellung der DIG-Sonde durch PCR mußte beachtet werden, daß die vom Hersteller (Roche) als optional angegebene Mischung der markierten DIG-dNTP's mit einer nicht markierten dNTP-Stammlösung im Verhältnis 1:2 erfolgte. Wurden ersatzweise nur markierte DIG-dNTP's eingesetzt, konnte nicht wie erhofft eine höhere Einbaurate erzielt werden. Stattdessen wurde, möglicherweise aufgrund sterischer Hinderung, kein PCR-Produkt erhalten.

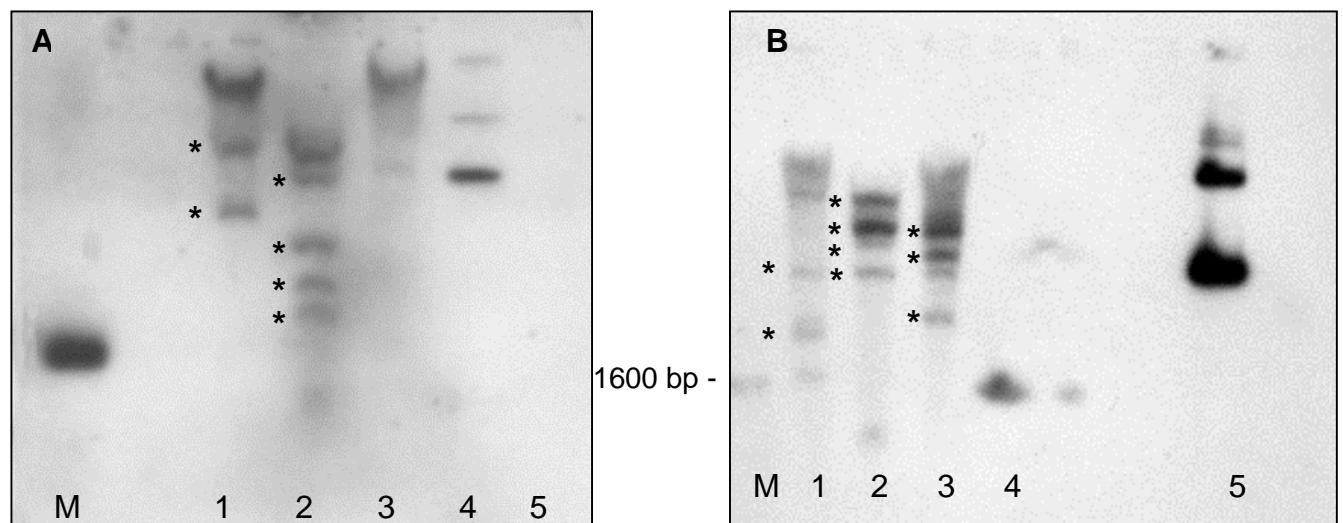
Im Rahmen der Optimierung des Southern-Blots hätte es eine Vereinfachung dargestellt, wenn sich die DNA-Sonden nach der Hybridisierung wieder hätten ablösen lassen, um entweder eine andere Hybridisierungstemperatur zu wählen oder die Hybridisierung mit einer anderen Sonde zu wiederholen. Es wurde daher getestet, ob

die Sonde durch "Strippen" abgelöst werden kann. Beim Vergleich des ursprünglichen und des "gestrippten" Blots mußte jedoch festgestellt werden, daß sich die hybridisierte Sonde bzw. die Antikörper durch die alkalische "Stripping"-Lösung nicht vollständig entfernen ließen. Dies war an z.T. identischen Hintergrundsignalen der ersten und zweiten Hybridisierung zu erkennen. Für jede Hybridisierung wurde daher ein eigener Southern-Blot angefertigt.

#### 3.1.2.2 Southern-Blot mit *hss*-spezifischer DIG-Sonde

Für den Southern-Blot mit der *hss*-spezifischen Sonde wurde die genomische DNA mit sechs verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, da ungeschnittene genomische DNA aus sehr langen Molekülen besteht, die sich im Agarosegel nicht auftrennen lassen und daher auch keine spezifischen Hybridisierungsbanden zeigen würden. Für die Wahl der Restriktionsenzyme war entscheidend, daß sie die DNA nach Möglichkeit vollständig schneiden, so daß keine ungeschnittene DNA übrig bleibt. Die für den Southern-Blot mit der *hss*-spezifischen Sonde verwendeten Restriktionsenzyme *Bgl*I, *Nde*I, *Eco*RI und *Hinc*II schneiden nicht im Gen für die HSS, während *Nco*I eine Schnittstelle nach 140 bp und *Eco*RV eine Schnittstelle nach 1252 bp besitzt. Bei dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen, die nicht im Gen schneiden (*Bgl*I, *Nde*I, *Eco*RI) waren nach der Hybridisierung mit der DIG-Sonde jeweils mindestens zwei deutlich zu erkennende Banden zu sehen, die auf das Vorkommen von zwei Genen oder zwei sehr unterschiedlichen Allelen schließen lassen (s. Abb. 3.5 A und B, entsprechende Banden mit \* gekennzeichnet). Die ebenfalls noch im Blot zu erkennenden schwächeren Banden resultieren möglicherweise aus unspezifischen Hybridisierungen, da die Sonden sehr lang sind. Auch ein Restriktionsverdau mit *Eco*RV sowie *Nco*I, die je einmal im Gen schneiden, deutet auf zwei Gene hin, da die DIG-Sonde an je vier Stellen hybridisierte. Trotz dreistündiger Inkubation und Zugabe des Restriktionsenzym im Überschuß konnte kein vollständiger Verdau der genomischen DNA erreicht werden. Zusätzlich zu den spezifischen Banden traten daher auch unspezifische auf, die aufgrund ihrer Größe ganz oben auf dem Blot zu finden waren. Dies führte auch zu einem Sensitivitätsverlust bei der Detektion. Als Positivkontrolle dienten bei diesem Blot 25 pg Plasmid-cDNA der HSS, die nach der Detektion des Southern-Blots zwei deutlich zu erkennende Banden zeigte. Ein Grund für die Mehrfachhybridisierung der Sonde mit der Plasmid-DNA könnte das Vorliegen der nicht linearisierten DNA in unterschiedlichen Topoisomeren ("supercoiled" und "relaxed" Form) sein, die im Gel unterschiedlich

aufgetrennt werden. Mit der Plasmid-cDNA der DHS als Negativkontrolle hybridisierte die Sonde dagegen nicht, so daß eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Sonden in diesem Fall ausgeschlossen werden konnte. Eine weitere unspezifische Hybridisierung war im Bereich des Markers bei 1600 bp zu erkennen, die für eine Größeneinordnung der spezifischen Banden genutzt werden konnte. Bei der 1,6 kb-Bande handelt es sich um ein Vektor-(pBR322) DNA-Fragment, das 10 % der gesamten Markermenge enthält. Möglicherweise fand dort eine unspezifische Hybridisierung aufgrund der hohen DNA Menge statt.



**Abb. 3.5:** Southern-Blot mit DNA aus *S. vernalis* WOK hybridisiert mit einer für die *hss*-spezifischen DIG-Sonde (\*: Banden, die auf das Vorkommen mehrerer *HSS*-Gene schließen lassen s. Text)

**A:**

M. 1 kb DNA-Leiter (2 µl) (Erläuterung s. Kap. 3.1.1 Abb. 3.1)

1. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *EcoRI*
2. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *EcoRV*
3. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *HincII*
4. cDNA der *hss* (Positivkontrolle) 25 pg
5. cDNA der *dhs* (Negativkontrolle) 25 pg

**B:**

M. 1 kb DNA-Leiter (2 µl) (Erläuterung s. Kap. 3.1.1 Abb. 3.1)

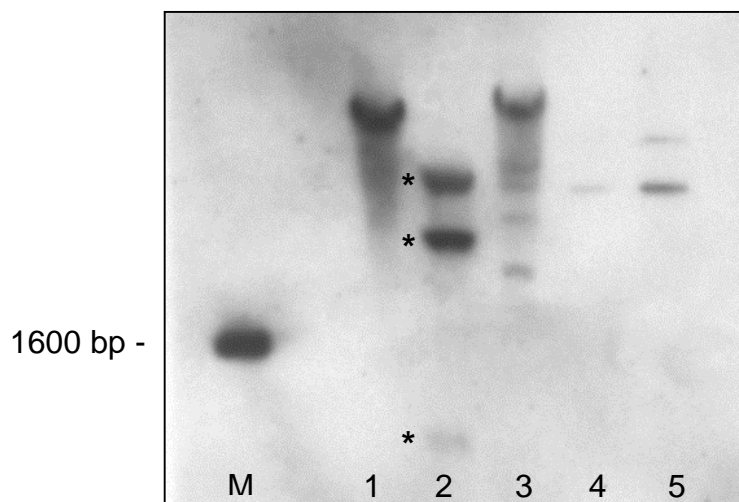
1. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *BglI*
2. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *NcoI*
3. Restriktionsverdau genomischer DNA aus *S. vernalis* (10 µg) mit *NdeI*
4. 1 kb DNA-Leiter (2 µl)
5. cDNA der *hss* (Positivkontrolle) 25 pg

Bei dem Southern-Blot mit der *hss*-spezifischen Sonde zeigte ein Vergleich von zwei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen (37 und 40 °C) die höhere Temperatur aufgrund eines schwächeren Hintergrundes bessere Ergebnisse als die niedrigere. Die Sonde löste sich wieder ab, wenn bei den anschließenden Waschgängen zur Entfernung nicht hybridisierter Sonde die Temperaturen mehr als 5 °C Grad höher gewählt wurden als die Hybridisierungstemperatur, um weniger unspezifische Hintergrundsignale zu erhalten. Dies reduzierte die Empfindlichkeit der Detektion. Das gleiche Phänomen trat auf, wenn die Blots stringenter mit Waschlösungen geringerer Salzkonzentration (0,1 x SSC) gewaschen wurden.

### 3.1.2.3 Southern-Blot mit der *dhs*-spezifischen DIG-Sonde

Für den Southern-Blot (s. Abb. 3.6) mit der für die *dhs*-spezifischen Sonde wurde genomische DNA aus *S. vernalis* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *EcoRV* und *HincII* verdaut. *EcoRI* schneidet einmal im Gen nach 369 bp, *EcoRV* zweimal nach 638 bp und 1433 bp und *HincII* wiederum einmal nach 1520 bp. Datenbankrecherchen ergaben, daß die DHS bei *Drosophila melanogaster* (<http://www.fruitfly.org/>) und *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>) nur als ein Gen im Genom vorliegt. Der Southern-Blot mit der *dhs*-spezifischen Sonde deutet auf ähnliche Verhältnisse bei *S. vernalis* hin, da z.B. bei einem Verdau mit *EcoRV*, das zweimal im Gen schneidet, nur drei unterschiedliche Fragmente erhalten werden. Nicht erklärt werden kann hingegen, das bei dem *HincII*-Verdau vier Fragmente erhalten werden, obwohl das Enzym nur einmal im Gen schneidet. Möglicherweise sind die vier sehr schwachen Banden auf unspezifische Hybridisierungen zurückzuführen, während die beiden zu erwartenden Fragmente noch zu groß sind, also in der großen Bande der ungeschnittenen DNA liegen. Um dieses Problem zu umgehen und kleinere Fragmente zu erhalten, die sich im Gel besser auftrennen lassen, könnte man eine kombinierte Restriktion mit einem zusätzlichen Enzym durchführen. Bei dem Verdau mit *EcoRI* waren keine spezifischen Hybridisierungssignale zu erkennen. Unspezifische Hybridisierungen traten auch hier wie bei der Hybridisierung mit der *hss*-spezifischen Sonde im Bereich der 1600 bp Bande der 1 kb-Leiter sowie bei nicht vollständig verdauter DNA auf. Daß die Restriktionsenzyme generell geschnitten haben, ist in Abb. 3.6 zu erkennen, die einen gleichmäßigen Schmier der mit Ethidiumbromid angefärbten genomischen DNA zeigt. Für die Hybridisierungstemperatur des Blots mit der *dhs*-

Sonde erwies sich eine im Vergleich zur *hss*-Sonde höhere Temperatur von 42 °C als günstig, die auch bei dem anschließenden Waschschrift mit 0,5 x SSC angewendet wurden. Auch hier führte ein stringenteres Waschen mit 0,1 x SSC zum Ablösen der Sonde. Die Sonde gegen die *dhs* aus *S. vernalis* hybridisierte sowohl mit der Plasmid-cDNA der DHS als auch schwach mit der Negativkontrolle (Plasmid-cDNA der HSS). Bei der Positivkontrolle zeigten sich zwei Banden, die wahrscheinlich ebenfalls durch verschiedene Topoisomere der nicht linearisierten DNA zustande kamen. Der Southern-Blot deutet somit darauf hin, daß die *dhs* als nur ein Gen bei *S. vernalis* vorliegt.



**Abb. 3.6:** Southern-Blot mit DNA von *S. vernalis* hybridisiert mit einer DIG-Sonde spezifisch für die *dhs*

M. 1 kb DNA-Leiter (s. Abb. 3.1)

1. Restriktionsverdau mit genomischer DNA aus *S. vernalis* *EcoRI* (10 µg)
2. Restriktionsverdau mit genomischer DNA aus *S. vernalis* *EcoRV* (10 µg)
3. Restriktionsverdau mit genomischer DNA aus *S. vernalis* *HincII* (10 µg)
4. cDNA der HSS (Negativkontrolle) 25 pg
5. cDNA der DHS (Positivkontrolle) 25 pg

## 3.2 Vergleichende Analyse zur gewebespezifischen Expression der HSS und DHS in *S. vernalis*

### 3.2.1 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene

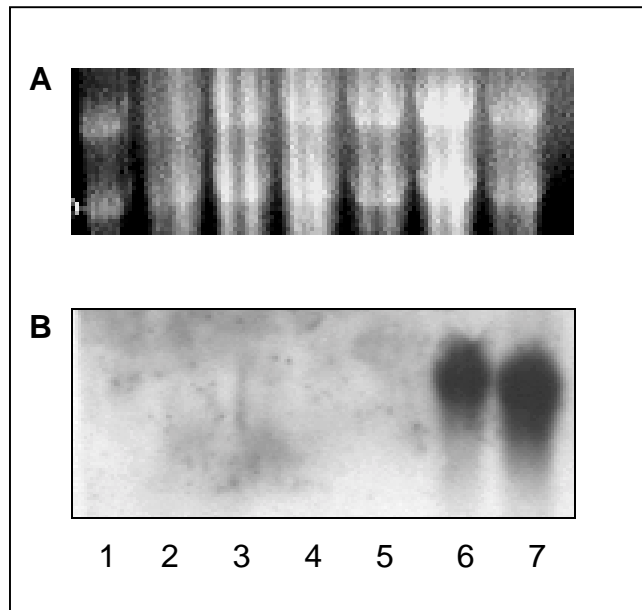
In vorausgegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die HSS, das Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese, aus der DHS, einem ubiquitären Enzym des Primärstoffwechsels, hervorgegangen sein mußte (Ober & Hartmann,

1999b). Da die beiden Enzyme bezüglich des Reaktionsmechanismus sehr ähnlich, aber nicht identisch sind, ergibt sich die Frage, wie individuell die beiden Gene reguliert sind. Ein wichtiges Indiz für die Spezifität der Regulation kann die gewebespezifische Expression der beiden Enzyme liefern. Um einen ersten Überblick zu bekommen wurde die Expression in verschiedenen Pflanzenorganen mit Hilfe von Northern-Blots untersucht.

#### 3.2.1.1 Northern-Blot

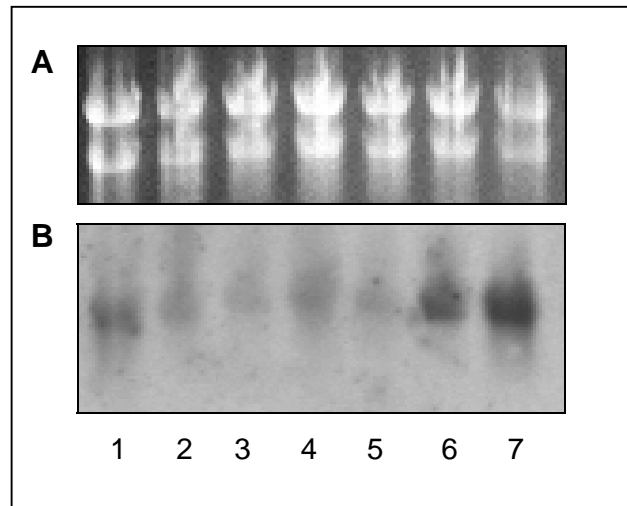
Ziel des Northern-Blots war es herauszufinden, wo die *hss* und die *dhs* transkribiert werden. Biochemische Untersuchungen (Hartmann & Toppel, 1987, Toppel et al. 1987) hatten ergeben, daß Pyrrolizidinalkaloide in *Senecio*-Arten nur in der Wurzel synthetisiert werden. Es war also zu erwarten, daß die HSS nur in der Wurzel vorkommt.

Bezüglich der Art des Northern-Blots wurde auf die Erfahrungen mit dem Southern-Blot zurückgegriffen (s. Kap. 3.1.2.1) und ein Kapillarblot-Verfahren eingesetzt. Dieser wurde nach drei bis vier Stunden abgeschlossen, da sich kurze Blotzeiten angesichts der Anfälligkeit der RNA für einen Abbau durch Ribonukleasen (RNasen) als günstiger erwiesen. Hier zeigte sich ebenso wie beim Southern-Blot (s. Kap. 3), daß sich die einmal hybridisierte Sonde mit einer dicht unter dem Siedepunkt erhitzten 0,1 %igen SDS-Lösung entgegen der Herstellervorschrift (Roche) nicht vollständig wieder dissoziieren ließ. Beim Northern-Blot sind die DNA-RNA-Hybriden sogar noch stabiler als DNA-DNA-Hybriden beim Southern-Blot, da ihre Schmelztemperatur höher liegt als die von DNA-DNA-Hybriden (Leitch et al., 1994). Neben diesem Faktor spielen aber z.B. auch die Länge, der Anteil an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) sowie die Umgebung der Nukleinsäurehybride für die Stabilität eine Rolle.



**Abb. 3.7:** **A** Mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel (0,8 %). Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen *S. vernalis*-Organen **B** Northern-Blot des Gels von (A) hybridisiert mit DIG-Sonde (Hybridisierungstemperatur: 42°C) spezifisch für *hss* aus *S. vernalis*. **1** Knospen, **2** junge Blätter **3** junger Sproß, **4** Blüten, **5**. alter Sproß, **6**. junge Wurzel, **7** alte Wurzel

In Abb. 3.7 wurde die Hybridisierung (42°C) der mRNA aus verschiedenen Geweben von *S. vernalis* mit einer *hss*-spezifischen DIG-Sonde analysiert. Hybridisierungssignale der Sonde mit der mRNA wurden nur bei der aus junger und älterer Wurzel gewonnenen Gesamt-RNA detektiert. Durch den Northern-Blot konnten somit die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen von Toppel und Hartmann (1987) bestätigt werden, nach denen die PA-Biosynthese nur in den Wurzeln abläuft (s. Abb. 3.7). In den anderen untersuchten Geweben von *S. vernalis* hybridisierte die für die *hss* spezifische DNA-Sonde weder mit RNA, die aus im Wachstum befindlichen Gewebe (Knospen, junge Blätter und Sproß) isoliert worden war, noch mit RNA aus älteren Pflanzenteilen (Blüten, alter Sproß). Die Transkription der *hss* in den Wurzeln zeigte ebenfalls keine deutliche Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Wurzeln, da bei beiden Wurzelstadien in etwa gleich starke Signale auftraten. Eine Korrelation der HSS-Aktivität mit dem Alter der Wurzeln war aufgrund der strikt an das Wachstum gekoppelten Pyrrolizidinalkaloid-Synthese in Asteraceen (Sander & Hartmann, 1989) vermutet worden, konnte aber durch obige Ergebnisse nicht bestätigt werden.



**Abb. 3.8:** **A** Mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel (0,8 %). Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzen-Organen von *S. vernalis*. **B** Northern-Blot hybridisiert mit DIG-Sonde spezifisch für die *dhs* aus *S. vernalis* (Hybridisierungstemperatur: 42°C)

1. Knospen, 2. junge Blätter, 3. junger Sproß, 4. Blüten, 5. alter Sproß, 6. junge Wurzel, 7. alte Wurzel

Bei der *dhs* dagegen zeigte sich, daß die DHS codierende mRNA in *S. vernalis* in allen untersuchten Geweben unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium nachweisbar ist (s. Abb. 3.8). Ein erhöhtes Vorkommen der DHS-mRNA konnte anhand der stärkeren Signale in der Knospe und den beiden Wurzelstadien belegt werden. Da jedoch Gesamt-RNA eingesetzt wurde, von der nicht bekannt ist, wieviel mRNA bzw. DHS-mRNA sie enthält, muß dieses Ergebnis jedoch vorsichtig bewertet werden. Die Versuche mit der DIG-markierten DNA-Sonde belegten das Vorkommen der HSS in der Wurzel und ein ubiquitäres Vorkommen der DHS. Für die mikroskopischen Lokalisationen der HSS in der Wurzel und der DHS in Blatt und Wurzel konnten auf diese Weise die zu untersuchenden Gewebe eingegrenzt werden.

Eine Alternative zu den mit der PCR hergestellten DIG-markierten DNA-Sonden stellen DIG-markierte RNA-Sonden dar, die den Vorteil haben, daß sie wesentlich empfindlicher sind und mit etwa einem Zehntel der zur RNA-DNA-Hybridisierungen üblicherweise eingesetzten RNA auskommen. Bei Verwendung einer RNA-Sonde, die in ihrer Herstellung allerdings aufwendiger und teurer ist, erhält man außerdem in der Regel schärfere Banden. Zugleich ermöglichen RNA-RNA-Hybridisierungen aufgrund der festeren Bindung ein stringenteres Waschen und somit eine Reduktion des Hintergrundes im Vergleich zu RNA-DNA-Hybridisierungen. In Vorversuchen wurde



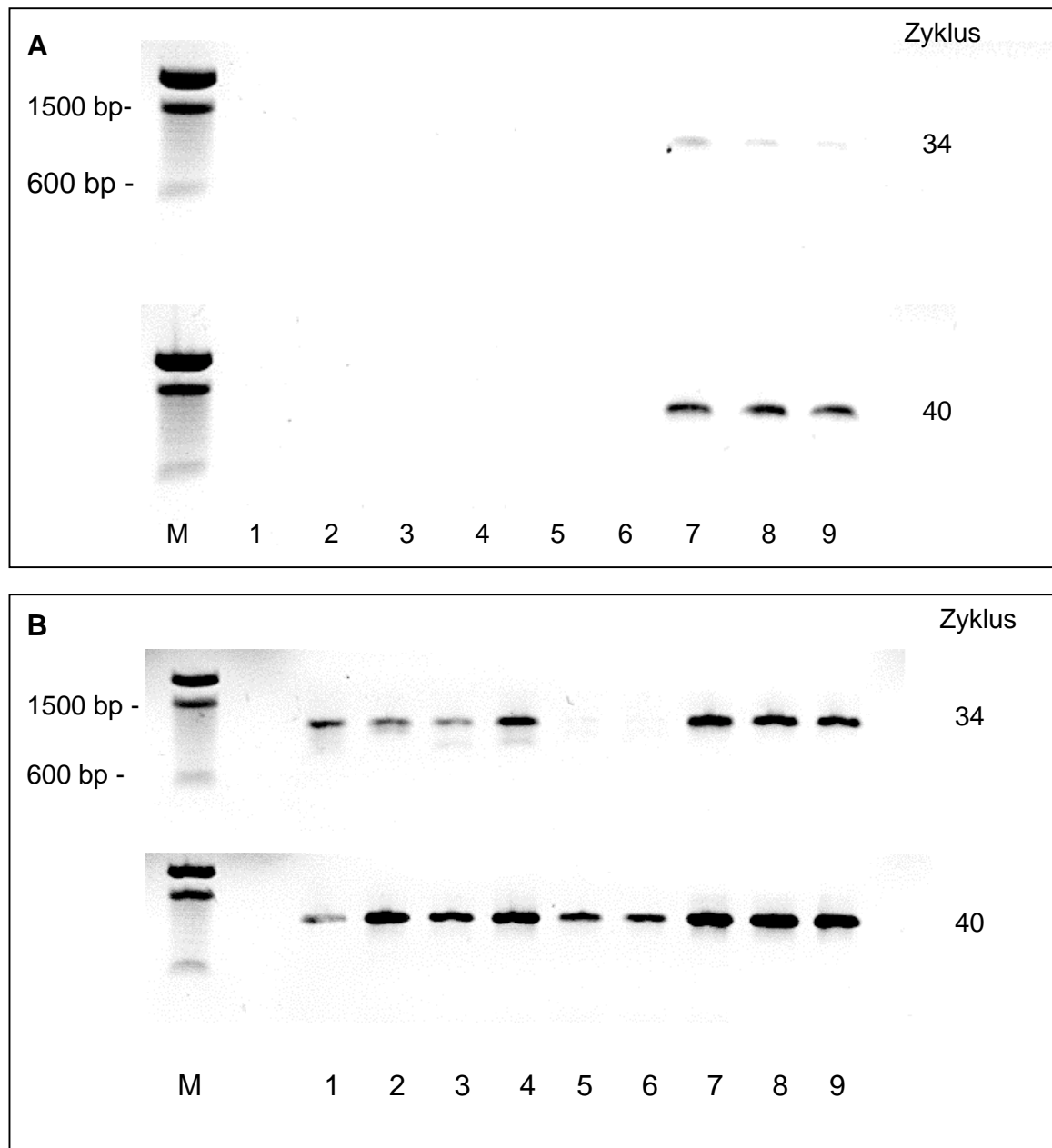
durch *in-vitro* Transkription eine RNA-Sonde hergestellt. Ihre Funktion wurde durch ein komplementäres Transkript überprüft. Im Northern-Blot hybridisierte diese Sonde allerdings nicht mit der mRNA.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen den *hss*- und *dhs*-Genen von 83 % konnte bei den Northern-Blots eine Kreuzreaktion zwischen den beiden DNA-Sonden und der jeweils anderen mRNA nicht ausgeschlossen werden. Bei der *dhs*-spezifischen Sonde hatte sich eine Kreuzreaktion mit Plasmid-cDNA der HSS sogar bereits gezeigt (s. Abb. 3.6). Daher wurde zur Absicherung der Ergebnisse noch eine RT-PCR (s. Kap. 3.2.1.2) durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit, hochspezifische Nukleinsäuresonden zu erzeugen, besteht in der Synthese von Oligonukleotiden, die so entworfen werden können, daß sie die Bereiche der Nukleinsäuresequenz mit den größten Unterschieden zwischen den beiden Genen beinhalten (s. Kap. 2.5.5). Beim Einsatz dieser Sonden bestand jedoch das Problem, daß trotz Variation der Hybridisierungstemperaturen bei der Detektion keine Signale erhalten wurden. Eine Überprüfung der Markierung der Oligonukleotidsonde konnte durch einen Dot-Blot-Test bestätigt werden (s. Kap. 2.5.6). Vermutlich reichte die DIG-Markierung am 3' Ende mit einer durchschnittlichen Länge von 2,5 DIG-dUTP'S für eine Detektion der relativ selten vorkommenden mRNA für ein Enzym des Sekundärstoffwechsels wie die HSS nicht aus.

#### 3.2.1.2 RT-PCR von *S.vernalis* und *N.tabacum*

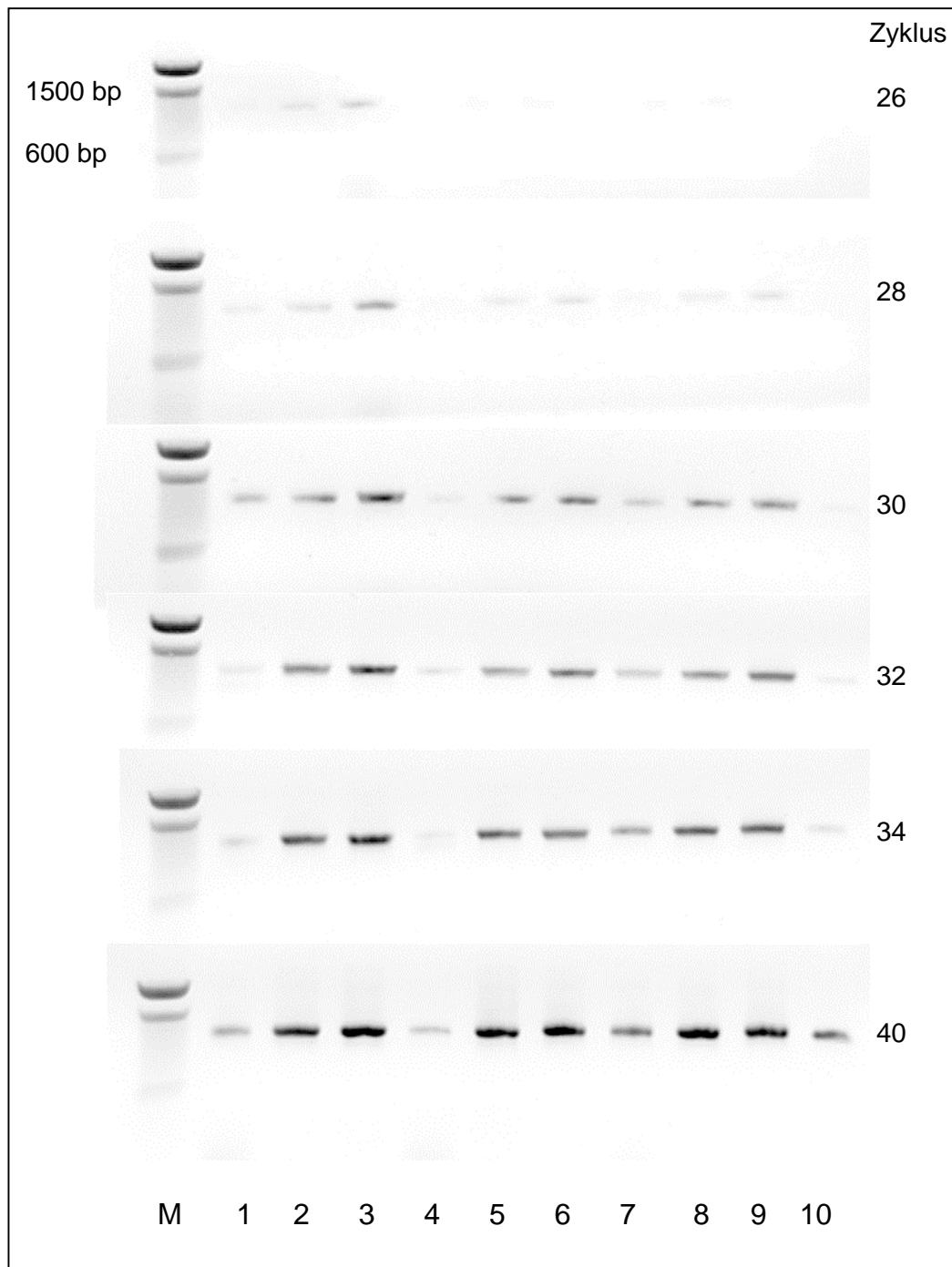
Die Reverse-Transkription-PCR diente ebenso wie der Northern-Blot dazu, die Transkription des Gens für die HSS bzw. DHS in bestimmten Geweben nachzuweisen. Eine quantitative Aussage über die mRNA im Gewebe mit dieser Methode ist schwierig, da selbst bei Verwendung eines internen oder externen Standards nur eine Information über die cDNA im Ansatz nicht aber über die Menge der mRNA im Ausgangsmaterial getroffen werden kann, da die reverse Transkription z.B. auch aufgrund von Sekundärstrukturen der RNA mit unterschiedlicher Effizienz verlaufen kann. Auch die Quantifizierung der RNA selbst ist problematisch, da der Quotient aus den Absorptionen bei 260 und 280 nm aufgrund des unterschiedlichen chemischen Hintergrundes in verschiedenen Geweben nicht konstant war. So lassen sich z.B. chlorophyllhaltiges Blattgewebe mit Wurzelgewebe nur schwer vergleichen. Zu Verfälschungen bei der Konzentrationsbestimmung der RNA kann es kommen, wenn sich die Absorptionsspektren der Verunreinigungen (z. B. Proteine, Absorptionsmaximum bei 280 nm) und der RNA (Absorptionsmaximum bei 260 nm) überschneiden. Eine

Möglichkeit zur Umgehung des Problems ist die Verwendung eines sogenannten *housekeeping genes* als externen Standard. Von diesem Gen wird angenommen, daß es in den zu untersuchenden Ansätzen konstant exprimiert wird und somit als Standard dienen kann. Gewöhnlich wird hierfür die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet (Apostolakos et al., 1993). Doch auch hier bleibt das Problem bestehen, daß die Regulation von *housekeeping*-Genen nicht immer konstant sein muß. Außerdem ist ein Vergleich dieser relativ stark exprimierten Gene mit schwächer exprimierten Genen schwierig. Da die Quantifizierung sich als relativ schwierig erwies und auch keine Sequenz eines "housekeeping"-Gens aus *S. vernalis* bekannt war, wurde auf eine Standardisierung verzichtet, zumal sie für die Lokalisation nicht notwendig war. Es sei denn, das *housekeeping*-Gen (z.B. ribosomale RNA) ist so konserviert, daß auch die Sonde aus anderen Organismen die entsprechende RNA bei *S. vernalis* erkennt. Da die RT-PCR aber mit den für die beiden Gene hochspezifischen full-length- Primern (s. Kap. 3.2.1.3) durchgeführt wurde, kann man bei der Amplifikation mit Hilfe der PCR im Gegensatz zum Northern-Blot eine Kreuzreaktivität ausschließen.



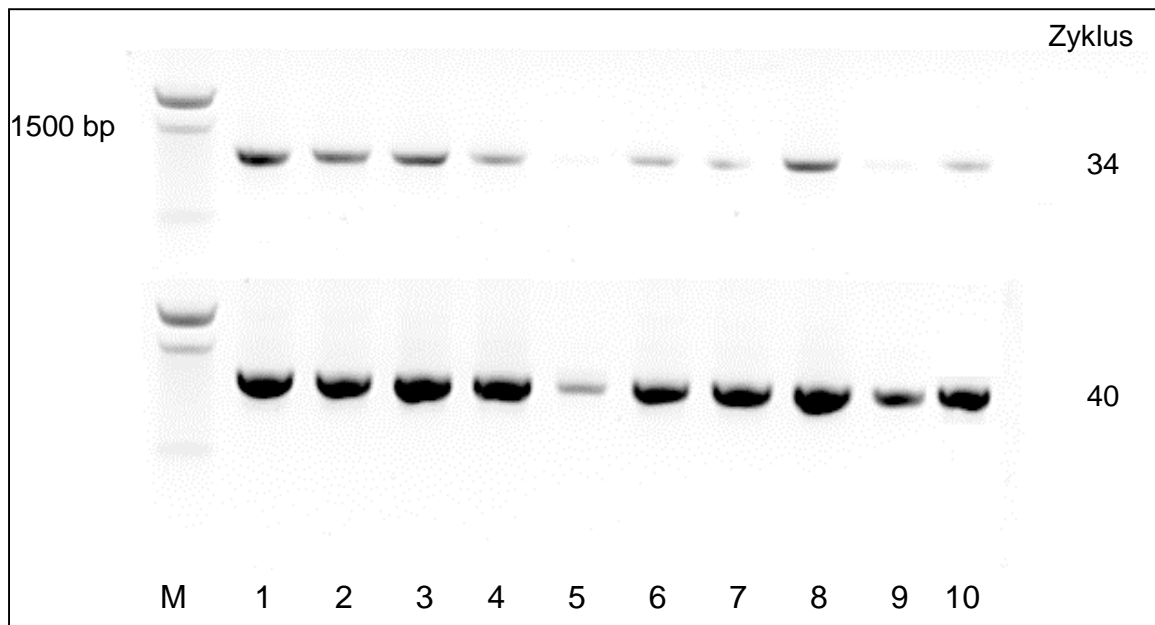
**Abb. 3.9:** RT-PCR mit cDNA verschiedener Gewebe von **A** *S. vernalis* mit für die *hss* spezifischen Primern **B** *S. vernalis* mit für die *dhs* spezifischen Primern: 100 bp-Leiter **M**, Knospe **1**, Blüte, **2** alte Blüte **3**, Sproß **4**, junges Blatt **5**, Blatt **6**, junge Wurzel **7**, mittlere Wurzel **8**, alte Wurze **9**

Die Proben mit einem Volumen von 4 µl wurden nach 34 und 40 PCR-Zyklen entnommen.



**Abb. 3.10:** RT-PCR mit cDNA verschiedener Gewebe von *N. tabacum* mit für die *dhs* spezifischen Primern: 100 bp-Leiter **M**, Wurzel **1**, junges Blatt **2**, altes Blatt **3**, Sproß **4**, Sproßspitze **5**, Kronblätter **6**, Staubblätter **7**, Griffel u. Narbe **8**, Fruchtknoten **9**, Frucht **10**

Die Proben mit einem Volumen von 4 µl wurden nach dem 26., 28., 30., 32., 34., und 40. PCR-Zyklus entnommen.



**Abb. 3.11:** RT-PCR mit cDNA verschiedener Fruchtknotenstadien von *N. tabacum* mit für die *dhs* spezifischen Primern. Im Stadium 0 der Tabakblüte ragten die Kronblätter etwa 1cm über den Kelch hinaus. Die weiteren Zahlen geben die Anzahl der Tage nach diesem Anfangsstadium an. Stadium 11 bezeichnet dabei die reife Frucht. **M** 100 bp-Leiter, **1** Stadium 0, **2** Stadium 1, **3** Stadium 2, **4** Stadium 4, **5** Stadium 5, **6** Stadium 6, **7** Stadium 7, **8** Stadium 8, **9** Stadium 9, **10** Stadium 11

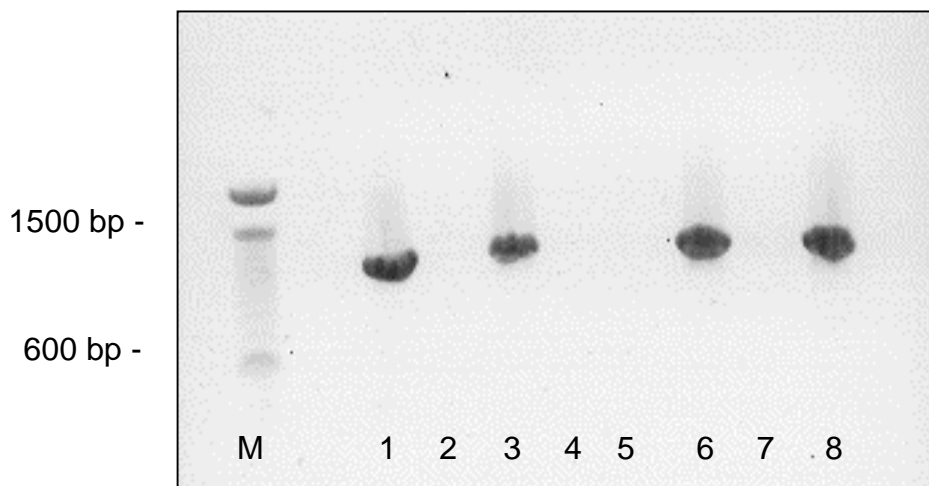
Die Proben mit einem Volumen von 4 µl wurden nach 34 und 40 PCR-Zyklen entnommen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die HSS in *S. vernalis* nur in der Wurzel transkribiert wird (s. Abb. 3.9). Die mRNA der DHS dagegen wurde sowohl bei *S. vernalis* (s. Abb. 3.9) als auch bei *N. tabacum* (s. Abb. 3.10) in allen untersuchten Geweben nachgewiesen. Durch die Ergebnisse der RT-PCR konnten somit die Ergebnisse des Northern-Blots bestätigt werden. Auffällig ist hierbei, daß sowohl Northern-Blot als auch RT-PCR für die HSS von *S. vernalis* die stärksten Signale bei der mRNA aus der Wurzel zeigten.

Arbeiten von Dresselhaus et al. (1999) haben gezeigt, daß die mRNA des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A) bei Mais im Fruchtknoten erhöht war. Da die DHS an der posttranslationalen Modifizierung des eIF5A beteiligt ist, wurden mittels RT-PCR verschiedene Fruchtknotenstadien untersucht, um Hinweise zu erhalten, ob möglicherweise auch die DHS-mRNA zu bestimmten Zeitpunkten der Fruchtreife deutlich gehäuft auftritt (s. Abb. 3.11). Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, da mit Ausnahme von einer Bande (Stadium 5 des *N. tabacum*-Fruchtknotens) alle in etwa die gleiche Stärke aufwiesen. Bei der schwächeren Bande lief die PCR

wahrscheinlich aufgrund technischer Fehler (z.B. Pipettierfehler) nicht optimal. Diese Vermutung konnte durch Wiederholung der PCR mit der entsprechenden cDNA als Template belegt werden (Ergebnis nicht dargestellt). Die mRNA der DHS von *N. tabacum* wurde entsprechend dem Northern-Blot ebenfalls in allen untersuchten Pflanzenteilen nachgewiesen.

Anhand einer PCR, bei der die Plasmid-cDNA von HSS bzw. DHS mit den full-length-Primern der jeweiligen Enzyme kombiniert wurde, konnte nachgewiesen werden, daß bei der RT-PCR zwischen den Primern keine Kreuzreaktivität auftrat (s. Abb. 3.12).



**Abb. 3.12:** Spezifitätsnachweis der Primer für die HSS bzw. DHS aus *S. vernalis* mit folgenden Primerkombinationen (Anzahl der Zyklen: 40):

Spur	forward Primer	reverse Primer	Template
1	Exp Klon A oligo for*	Exp Klon A rev**	Klon A
2	Exp Klon A oligo for	Exp Klon A rev	Klon B
3	Exp Klon A for	Exp Klon A rev	Klon A
4	Exp Klon A for	Exp Klon A rev	Klon B
5	Exp Klon B oligo for	Exp Klon B rev	Klon A
6	Exp Klon B oligo for	Exp Klon B rev	Klon B
7	Exp Klon B for	Exp Klon B rev	Klon A
8	Exp Klon B for	Exp Klon B rev	Klon B

\* mit Exp Klon oligo gekennzeichnete Primer wurden für die Synthese von für das Gen der HSS bzw. DHS hochspezifischen Oligonukleotiden entworfen (s. Kap. 3.2.1.1)

\*\* mit EXP gekennzeichnete Primer wurden ursprünglich zur Amplifikation des gesamten codierenden Bereichs einer cDNA entworfen; Klon A bezeichnet die cDNA der HSS und Klon B die cDNA der DHS aus *S. vernalis*; M= 100 bp-Leiter

Läßt man die RT-PCR ohne Unterbrechung 40 Zyklen durchlaufen, so treten stärkere Banden auf als bei der gleichen PCR mit sukzessiver Probennahme (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.13). Lief die PCR ohne Unterbrechungen, also unter optimalen Bedingungen, waren bei den Geweben außer der Wurzel keine Andeutungen einer Bande zu erkennen, was die Spezifität der Expression der HSS ausschließlich in der Wurzel unterstreicht. Wurde die PCR aber mit den Unterbrechungen für die Probennahmen durchgeführt, traten die Banden in der Regel erst nach dem 28. bzw. 30. Zyklus auf. Durch die ständigen Unterbrechungen und die Verringerung des Volumens läuft die PCR offensichtlich nicht mehr unter optimalen Bedingungen ab. Daher ist es ausreichend die Probennahme erst zu einem späten Zeitpunkt (28. und 30. Zyklus) zu beginnen und läßt die vorherigen Probennahmen wegfallen. Dies hätte außerdem zur Folge, daß die Banden aufgrund geringerer, durch die Probennahmen bedingte Störungen intensiver würden.



**Abb. 3.13:** RT-PCR von *S. vernalis* mit HSS-spezifischen Primern. Die Probennahme erfolgte nach dem 40. Zyklus.

100 bp-Leiter **M**, Knospe **1**, Blüte **2**, alte Blüte **3**, Sproß **4**, junges Blatt **5**, Blatt **6**, junge Wurzel **7**, mittlere Wurzel **8**, alte Wurzel **9**

### 3.2.1.3 Vergleich der Expressionsmuster

Die folgenden Tabellen (Tab. 3.1 und Tab. 3.2) zeigen nochmal im Vergleich die Ergebnisse von Northern-Blot und der RT-PCR. Da die Sonden für die Northern-Blots mit Hilfe der PCR und den full-length-Primern des jeweiligen Enzyms hergestellt wurden, also aus der cDNA in voller Länge bestehen, sind die Sonden aufgrund ihrer Länge und der damit verbundenen hohen Einbaurate markierter dUTP's sehr empfindlich. Dies hat den Vorteil, daß auch selten vorkommende mRNA's detektiert werden können. Da die Sonden aufgrund der hohen Sequenzhomologie der *hss* und *dhs* auf Nukleinsäureebene jedoch nicht hochspezifisch für die beiden Gene sind, traten

Kreuzreaktionen zwischen den beiden Sonden auf (s. Abb. 3.6). Auch die RT-PCR dient dem Nachweis der Transkription eines Gens in bestimmten Geweben. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation des Templates stellt sie eine noch empfindlichere Methode als der Northern-Blot dar. Auf die Probleme beim Quantifizieren der beiden Methoden war bereits eingegangen worden (s. Kap. 3.2.1.2).

Northern-Blot und RT-PCR bestätigen ebenso wie bei *S. vernalis* auch bei *N. tabacum*, daß die *dhs* in allen untersuchten Geweben vorkommt (s. Tab. 3.2).

Aufgrund der Ergebnisse von zwei unabhängigen Methoden (Northern-Blot und RT-PCR) kann man zur Expression der mRNAs für die HSS bzw. die DHS sagen, daß sich das Vorkommen der HSS von *S. vernalis* ausschließlich auf die Wurzel unabhängig von deren Alter beschränkt. Die DHS dagegen kommt sowohl bei *S. vernalis* als auch bei *N. tabacum* in allen untersuchten Geweben ebenfalls unabhängig von deren Entwicklungsstadien vor. Die Expressionsmuster geben Hinweise darauf, daß die DHS in den Wurzeln bei *S. vernalis* gehäuft auftritt.

Gewebe	Northern-Blot	RT-PCR
Knospen	-	-
junge Blüten	-	-
alte Blüten	-	-
junger Sproß	-	-
alter Sproß	-	-
junges Blatt	-	-
junge Wurzel	+	+
alte Wurzel	+	+

**Tab. 3.1:** Lokalisation und Expression der mRNA für die HSS in verschiedenen

*S. vernalis* Geweben

Sowohl der Northern-Blot als auch die RT-PCR zeigen, daß die HSS bei *S. vernalis* nur in der Wurzel transkribiert wird (s. Tab. 3.1).



Gewebe	<i>S. vernalis</i>			<i>N. tabacum</i>	
	Northern- Blot	quantitative PCR	RT-	quantitative PCR	RT-
Knospen	+	+		+	
junge Blüten	n.b.	+		+	
alte Blüten	+	+		+	
junger Sproß	+	+		+	
alter Sproß	+	+		+	
junges Blatt	+	+		+	
junge Wurzel	+	+		+	
alte Wurzel	+	+		+	

**Tab. 3.2:** Lokalisation und Expression der mRNA für die DHS in verschiedenen Geweben von *S. vernalis* und *N. tabacum*, n.b.-nicht bestimmt

### 3.2.2 Expressionsanalyse auf Proteinebene

Für die Lokalisation der HSS und DHS war es notwendig für beide Enzyme spezifische Antikörper zu gewinnen, um die beiden Enzyme im Blot und im Gewebe spezifisch markieren zu können.

#### 3.2.2.1 Gewinnung spezifischer Antikörper gegen die HSS und DHS aus *S. vernalis*

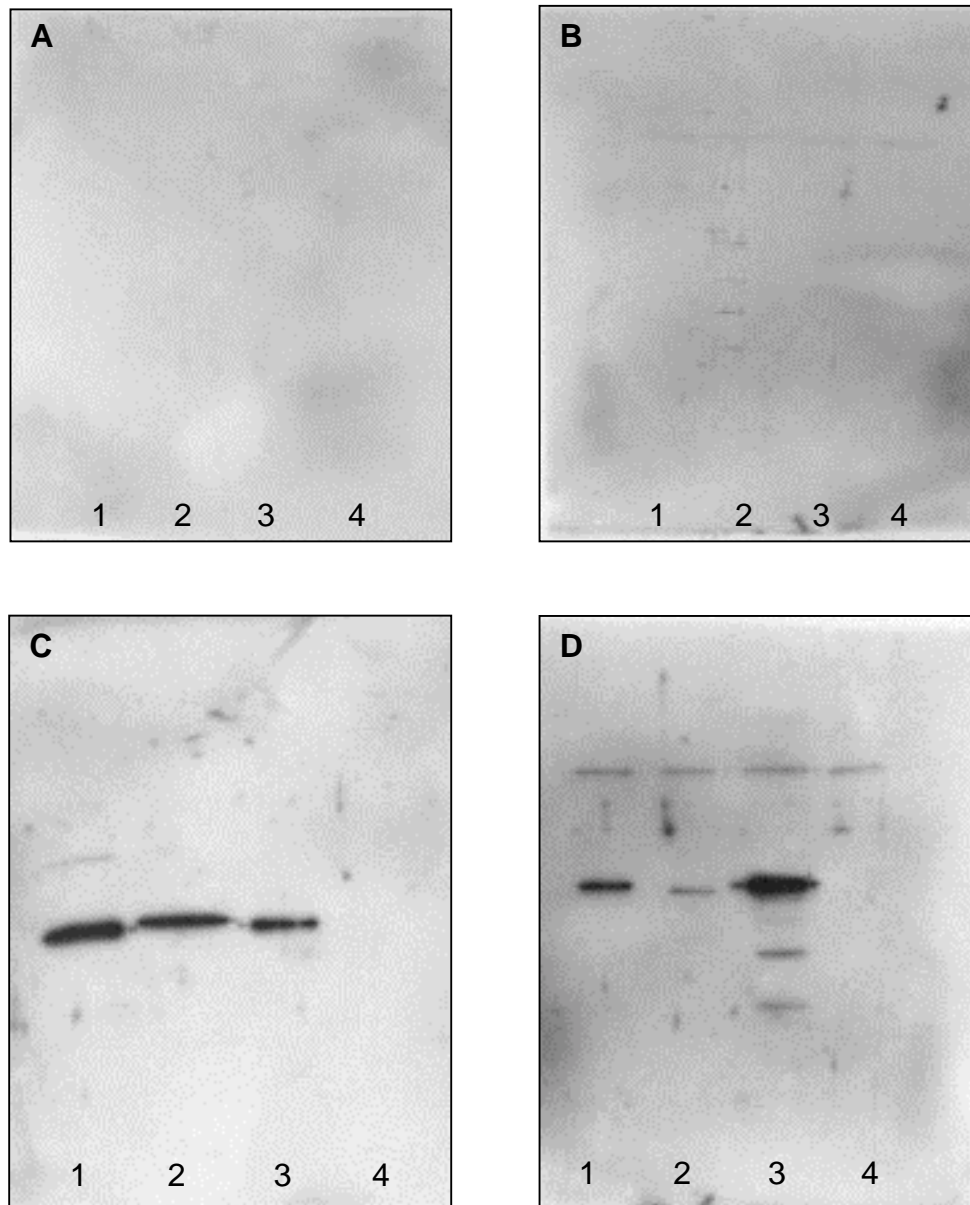
Für Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis* lag bereits ein Rohserum von einem immunisierten Kaninchen vor. Die DHS-spezifischen Antikörper mußten erst noch erzeugt werden: Für die Antikörpergewinnung gegen die DHS aus *S. vernalis* und *N. tabacum* wurden zwei Kaninchen im Verlauf dieser Arbeit mit gereinigtem (Protokoll nach Ober & Hartmann, 1999b) rekombinantem Protein immunisiert (s. Kap. 2.8.1).

#### 3.2.2.2 Kreuzreaktivität der Seren

Für die Prüfung auf mögliche Kreuzreaktionen bzw. des Antikörpertiters wurden zunächst sowohl die Präimmunseren- als auch die First-Bleeding-Seren getestet. Bei

dem Präimmunserum handelt es sich um Serum, das vor der Immunisierung entnommen wurde. Das First-Bleeding-Serum wurde am 35. Tag nach der ersten Injektion den Kaninchen abgenommen und dient einer ersten Überprüfung des Antikörpertiters. Alle Seren wurden 1:5000 verdünnt und gegen rekombinantes Protein der HSS und DHS aus *S. vernalis* sowie der DHS aus *N. tabacum* im Western-Blot getestet (s. Abb. 3.14). Das First-Bleeding-Serum gegen die DHS aus *S. vernalis* zeigte bei allen drei Proteinen Immunantworten ohne deutliche Unterschiede in ihrer Intensität, nicht aber bei den Wirtsproteinen (leerer Vektor), so daß es sich bei den auftretenden Kreuzreaktionen nicht um unspezifische Reaktionen gegen Proteine aus *E. coli* handeln kann (s. Abb. 3.14 C). Da aber keine definierten Proteinmengen aufgetragen wurden, lassen sich keine Schlüsse über die Stärke der Kreuzreaktionen ziehen. Trotzdem kann daraus geschlossen werden, daß der polyklonale Antikörper gegen die DHS aus *S. vernalis* aufgrund der hohen Ähnlichkeit auf Aminosäureebene weder zwischen HSS und DHS noch die beiden DHS voneinander unterscheiden kann. Beim Kontrollansatz mit Präimmunserum (s. Abb. 3.14 A) erfolgte keine Immunantwort, so daß das Präimmunserum bei den immunologischen Versuchen als Negativkontrolle verwendet werden konnte.

Bei dem First-Bleeding Serum gegen die DHS aus *N. tabacum* (s. Abb. 3.14 D) zeigte sich bezüglich der Immunantworten ein ähnliches Bild wie bei der DHS aus *S. vernalis*. Die Immunantworten gegen die HSS aus *S. vernalis* und die DHS aus *S. vernalis* sowie *N. tabacum* wiesen nur geringe unterschiedliche Intensitäten auf. Die DHS aus *N. tabacum* zeigte hierbei das intensivste Signal. Im Bereich des leeren Vektors wurden auch hier ebenso wie beim First-Bleeding-Serum gegen die DHS aus *S. vernalis* keine Immunantworten festgestellt. Da aber auch hier keine definierten Proteinmengen aufgetragen wurden, lassen sich keine Schlüsse über die Stärke der Kreuzreaktionen ziehen. Aufgrund dieser Kreuzreaktionen war es jedoch notwendig, die polyklonalen Antikörper über Affinitätschromatographie (s. Kap. 3.2.2.3) zu reinigen. Im folgenden wurde sich auf die Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper gegen die HSS bzw. DHS aus *S. vernalis* beschränkt.



**Abb. 3.14:** Western-Blot mit Präimmunserum und First-Bleeding-Serum gegen die DHS aus *S. vernalis* und *N. tabacum*, aufgetragen wurden rekombinantes Protein der HSS aus *S. vernalis* **1** der DHS aus *S. vernalis* **2** der DHS aus *N. tabacum* **3** und leerer Vektor **4**

**A** Inkubation mit Präimmunserum (1:5000 verdünnt) gegen die DHS aus *S. vernalis* bzw. **B** gegen die DHS aus *N. tabacum*

**C** Inkubation mit First-Bleeding-Serum (1:5000 verdünnt) gegen die DHS aus *S. vernalis* bzw. **D** gegen die DHS aus *N. tabacum*

### 3.2.2.3 Affinitätsreinigung der Antikörper

Vorversuche (s. Kap. 3.2.2.2) haben gezeigt, daß Kreuzreaktionen zwischen dem HSS-Antikörper aus *S. vernalis* (Sv-HSS-Ak) und der DHS sowie umgekehrt zwischen dem DHS-Antikörper aus *S. vernalis* (Sv-DHS-Ak) mit der HSS auftreten können. Daher

wurde versucht durch Affinitätsreinigung die Spezifität der polyklonalen Antikörper zu erhöhen, um Kreuzreaktionen bei der Lokalisation der Enzyme im Gewebe auszuschließen.

Ziel der dreistufigen Reinigung der HSS nach einem Protokoll von Ober (1997) war es, genügend Protein zu erhalten, um das Enzym an eine Matrix für eine Affinitätschromatographie zu koppeln und dann den polyklonalen Antikörper gegen die HSS von *S. vernalis* aus dem Hauptserum zu reinigen. Der gereinigte Antikörper sollte anschließend für immunohistologische Untersuchungen eingesetzt werden (s. Kap. 3.3). Für die Affinitätschromatographie standen zwei Materialien der Firma Pharmacia zur Verfügung: Die CH Sepharose 4B hat als 6 atomigen Spacer 6-Aminohexansäure und eine Ligandenbindungskapazität von 2 bis 5 mg Protein pro ml Gel. Die CNBr aktivierte Sepharose besitzt dagegen keinen Spacer, dafür aber eine höhere Bindungskapazität von 5 bis 10 mg Protein pro ml Gel.

Aus dem Reinigungsgang für die HSS wurden 0,5 mg Protein gewonnen und an die aktivierte Sepharose 4B gekoppelt, die dann für die Reinigung des polyklonalen Antikörpers gegen die HSS aus *S. vernalis* eingesetzt wurde. Bei einer optischen Dichte von weniger als 0,6 können Antikörper beim Einfrieren ihre Antigenität verlieren (Harlowe & Lane). Sie müssen deshalb aufkonzentriert werden bzw. kann man, wenn sie nicht markiert werden sollen, 1 % BSA zur Stabilisierung zusetzen. Nach der Reinigung und Aufkonzentrierung wies der Antikörper eine OD<sub>280</sub> von 0,88 auf, so daß er ohne Antigenitätsverlust bei -20 C eingefroren werden konnte.

Bei der Reinigung des Antikörpers gegen die DHS aus *S. vernalis* wurde ein etwas vereinfachtes Verfahren eingesetzt. *E. coli*-Zellen, die die DHS überexprimieren, wurden durch Sonifizierung aufgeschlossen und das Bakterienlysate ohne vorhergehende Reinigung in einer Konzentration von etwa 3 mg Gesamtprotein pro ml gequollener CNBr Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) an die Matrix gekoppelt. Da das gesamte Protein der überexprimierenden *E.coli*-Kultur - in dem die DHS gemäß eines SDS-Gels ca. 30 % des Gesamtproteins ausmachten - an die Matrix gekoppelt wurde, wurde ein Säulenmaterial mit einer höheren Proteinbindungskapazität als die CH Sepharose 4B gewählt. Sterische Hinderungen aufgrund des fehlenden Spacers spielten offensichtlich keine Rolle. Die OD<sub>280</sub> des affinitätsgereinigten Sv-DHS-Ak betrug 0,61. Diese Methode wurde insbesondere bei der "Kreuzreinigung" von Antikörpern eingesetzt. Das Prinzip der "Kreuzreinigung" beruht auf der hohen Homologie der beiden Enzyme. Gibt man das Hauptserum mit dem gewünschten Antikörper auf eine Affinitätssäule, an die das kreuzreagierende Protein gekoppelt ist,

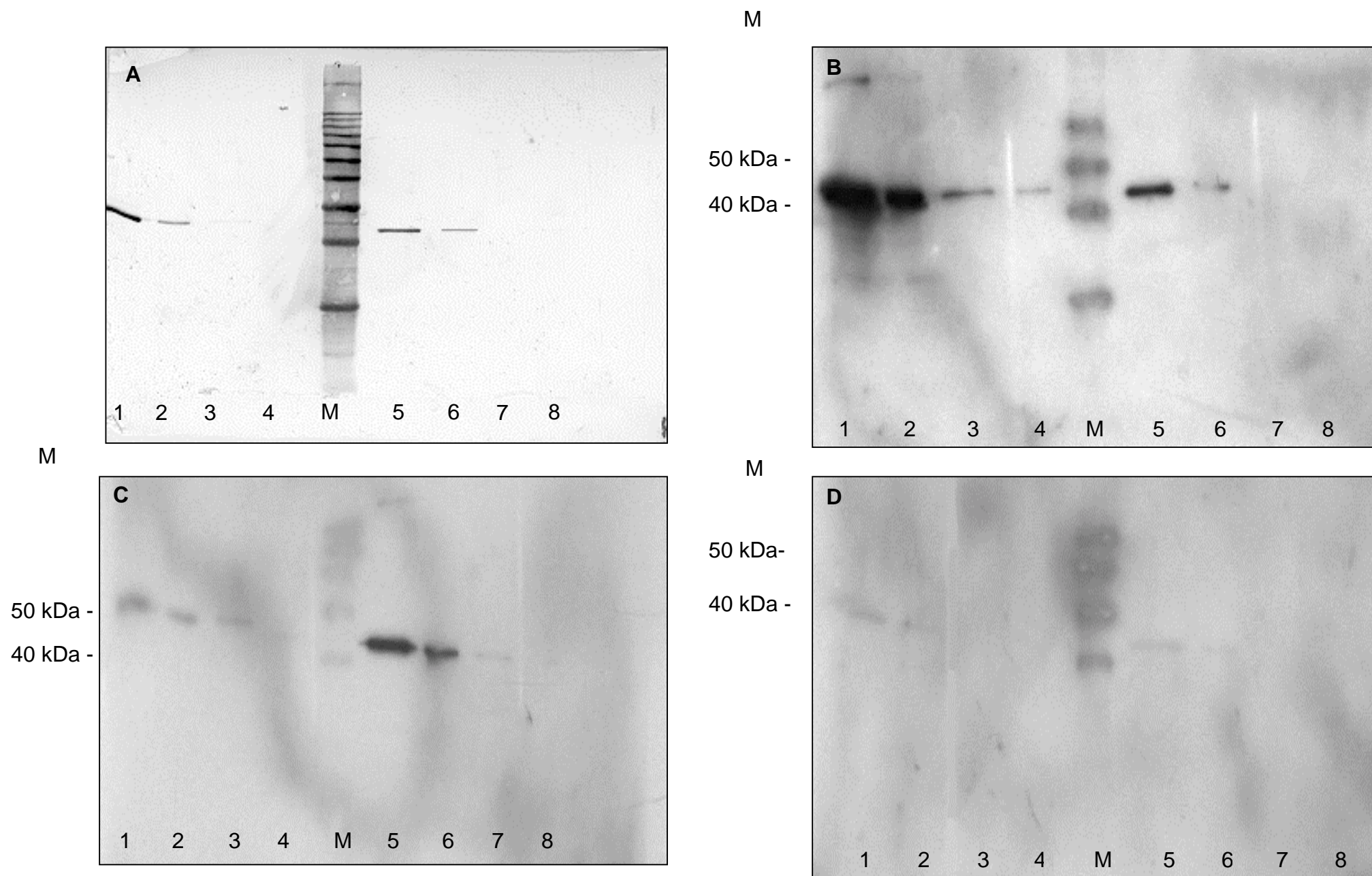
werden die kreuzreagierenden Antikörper gebunden. Anschließend gibt man den Durchlauf auf eine Affinitätssäule, die das Protein enthält, mit dem das Kaninchen immunisiert wurde. Das Eluat sollte hochspezifische Antikörper gegen das gewünschte Antigen enthalten. Diese Methode hatte neben der Zeitersparnis für die nicht durchgeführte Enzymreinigung den Vorteil, daß bei einer "Kreuzreinigung" des Antikörpers gegen die HSS nicht nur Antikörper gegen die DHS sondern auch eventuell vorhandene Antikörper gegen *E.coli*-Proteine, die zu unspezifischen Signalen führen können, entfernt werden. Umgekehrt gilt dies natürlich auch für die Kreuzreinigung des DHS-Antikörpers.

Als Alternative, um Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern gegen die HSS und DHS zu verhindern, sollten spezifische Peptide hergestellt werden, über die die beiden Antikörper gegen die HSS bzw. DHS aufgereinigt werden können. Zur Herstellung der Peptide wurde jeweils ein relativ kurzer Sequenzbereich der jeweiligen cDNA durch PCR amplifiziert, um diesen dann in *E.coli* exprimieren zu lassen. In beiden Fällen ist es jedoch nicht gelungen das Konstrukt in einen Vektor zu ligieren. Möglicherweise waren die Inserts für eine erfolgreiche Ligation zu klein.

#### 3.2.2.4 Western-Blot zur Bestimmung der Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS und DHS aus *S. vernalis*

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen der HSS und der DHS aus *S. vernalis* von 79 % auf Proteinebene bzw. von 80 % zwischen den beiden DHSs aus *S. vernalis* und *N. tabacum* (Ober & Hartmann, 1999) wurde ebenso wie bei den Nukleinsäuresonden (s. Kap. 3 und 3.2.1.1) auf eine mögliche Kreuzreaktion der Antikörper dieser beiden Enzyme getestet. Da die Antikörper für die Lokalisation der HSS und der DHS in *S. vernalis* verwendet werden sollten, war es wichtig die Spezifität der Antikörper zu kennen.

**Abb. 3.15:** (folgende Seite) **A** SDS-PAGE geblottet auf PVDF-Membran, gefärbt mit Indian-Ink **B** Western-Blot: PVDF-Membran, die HSS- und DHS-Protein analog zum SDS-PAGE-Gel enthält, inkubiert mit affinitätsgereinigtem HSS-Antikörper ( $OD_{280} = 4,395 \times 10^{-7}$ ) **C** Membran entsprechend B mit affinitätsgereinigtem DHS-Antikörper ( $OD_{280} = 4,395 \times 10^{-7}$ ) inkubiert **D** Membran entsprechend B mit "kreuzgereinigtem" HSS-Antikörper ( $OD_{280} = 4,395 \times 10^{-5}$ ) inkubiert. Aufgetragen wurden rekombinantes HSS-Protein aus *S. vernalis* in folgenden Konzentrationen: **1** 250 ng, **2** 50 ng, **3** 10 ng, **4** 2,5 ng, **M** 10 kDa Proteinleiter bzw. rekombinantes DHS-Protein aus *S. vernalis* in folgenden Konzentrationen: **5** 250 ng, **6** 50 ng, **7** 10 ng **8** 2,5 ng



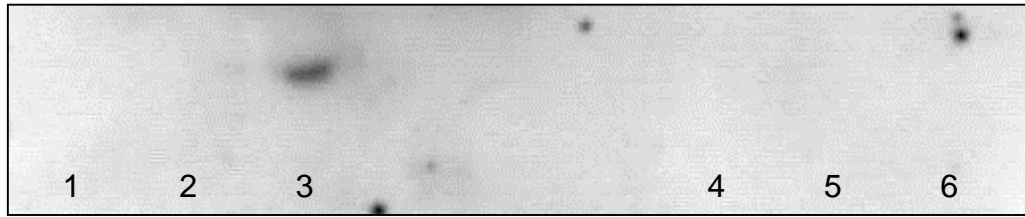
**Abb. 15:** SDS-PAGE-Gel (geblottet auf PVDF-Membran) und Western-Blots mit verschiedenen Antikörpern (Legende vorherige Seite)

Der Western-Blot des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers aus *S. vernalis* (SvHSS-Ak) gegen die HSS und DHS (s. Abb. 3.15 B) zeigte, daß eine Kreuzreaktion nur bei hohen Antigen-Konzentrationen (250 und 50 ng) der DHS aus *S. vernalis* auftrat. Die HSS erkannte der HSS-spezifische Antikörper dagegen noch bis zu einer Konzentration von 2,5 ng. Im umgekehrten Fall, d.h. bei der Überprüfung der Kreuzreaktivität des affinitätsgereinigten DHS-Antikörpers gegen die HSS (s. Abb. 3.15 C) zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier wurden die beiden höchsten Proteinkonzentrationen (250 ng und 50 ng) erkannt, doch rief der SvDHS-Ak insgesamt schwächere Signale, trotz gleicher Proteinkonzentration hervor und schien somit eine geringere Antigenität zu haben. Dies zeigte sich ebenfalls darin, daß der SvDHS-Ak das DHS-Protein nur bis zu einer Konzentration von 10 ng erkannte. Eine Ursache für die schlechtere Antigenität des SvDHS-Ak könnte darin liegen, daß die Affinitätsreinigung des Antikörpers mit dem Bakterienlysat anstatt mit dem gereinigtem Protein erfolgte.

Mittels einer "Kreuzreinigung" (s. Kap. 3.2.2.3) sollte die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper noch erhöht werden. Der "kreuzgereinigte" HSS-Antikörper rief jedoch nur sehr schwache Signale hervor (s. Abb. 3.15 D). Hierbei wurden sogar HSS und DHS ohne Unterschied in der Empfindlichkeit erkannt. Durch die "Kreuzreinigung" ist es folglich nicht gelungen die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen. Stattdessen wurde die Antigenität verringert, da aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Proteine und damit aufgrund der vielen bei beiden Enzymen gleichen Epitope sehr viel SvHSS-Ak entfernt wurde.

In vorhergehenden Arbeiten war eine *in-situ*-Lokalisation der HSS in *S. vernalis*-Wurzeln mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen die HSS aus dem phototrophen Eubakterium *Rhodospseudomonas viridis* versucht worden, da die bakterielle gegenüber der pflanzlichen HSS eine höhere Stabilität aufweist. Biochemische Untersuchungen der HSS aus *S. vernalis* haben jedoch gezeigt, daß es sich bei der Immunlokalisation mit dem Antikörper gegen die HSS aus *R. viridis* um falsch positive Markierungen gehandelt hat (Ober, 1997). Im Zuge der Optimierung der Spezifität des SvHSSAk wurde auch nochmal der bakterielle HSS-Antikörper auf eine mögliche Kreuzreaktivität getestet. Hierbei zeigte sich, daß der gereinigte Antikörper spezifisch für die HSS aus *S. vernalis* ist und die aus *R. viridis* nicht erkennt (s. Abb. 3.16). Dies deckt sich mit der Tatsache, daß die bakterielle HSS keine Homologie zur pflanzlichen HSS bzw. DHS zeigt (Ober & Hartmann, 2000).

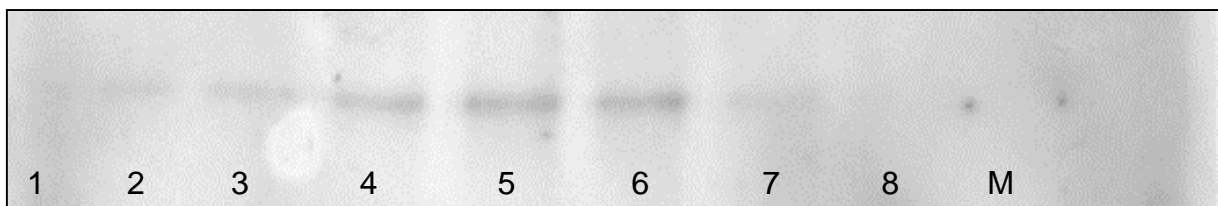




**Abb. 3.16:** Western-Blot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis* und Protein-Rohextrakten von *S. vernalis*-Wurzeln (**1** 100 ng **2** 500 ng **3** 1µg) sowie *R. viridis* (**4** 100 ng **5** 500 ng **6** 1µg)

### 3.2.2.5 Western-Blot von verschiedenen Wurzelstadien

Um für die spätere Lokalisation der HSS eine Aussage treffen zu können, ob die HSS bei *S. vernalis* in bestimmten Wurzelabschnitten gehäuft oder vielleicht garnicht auftritt, wurde ein Western-Blot mit Protein-Extrakten unterschiedlicher Wurzelbereiche durchgeführt (s. Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** Western-Blot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen die HSS aus *S. vernalis* gegen Protein-Rohextrakte verschiedener Wurzelstadien von *S. vernalis*: erster cm von der Wurzelspitze **1**, zweiter cm der Wurzel **2**, dritter cm der Wurzel **3**, vierter cm der Wurzel **4**, fünfter cm der Wurzel **5**, sechster cm der Wurzel **6**, Hypokotyl (weißer Bereich) **7**, Hypokotyl (grüner Bereich) **8**, 10 kDa Proteinleiter **M**

Der Western-Blot (s. Abb. 3.17) zeigt, daß die HSS in allen Wurzelbereichen mit Ausnahme der Wurzelspitze vorkommt. Unklar ist das Ergebnis beim Hypokotyl. Der Blot wurde zweimal mit getrennt aufgearbeiteten Proteinextrakten durchgeführt, wobei nur der eine Blot im Bereich des weißen Hypokotyls ein deutliches Immunsignal aufwies. Ein Grund hierfür könnten noch am Hypokotyl anhaftende Reste von Wurzeln sein. Aufgrund der geringen Mengen des zur Verfügung gestandenen Wurzelmaterials sind die Banden insgesamt nur sehr schwach.



### **3.3 *in-situ*-Lokalisation von HSS und DHS durch Immunogold-markierung mit Silver- Enhancement und Fluoreszenzmarkierung**

#### **3.3.1 Etablierung und Optimierung von Gewebeeinbettungen für Antikörpermarkierungen**

##### **3.3.1.1 Fixierung von Geweben**

Bei der Fixierung von Geweben für die Immunocytochemie ist es wichtig, daß sowohl die Struktur der Gewebe als auch eine gute Antigenität der nachzuweisenden Proteine erhalten bleibt. Die beste Möglichkeit eine Auswaschung von Antigenen zu vermeiden stellt die Fixierung durch Quervernetzung dar. Sowohl Formaldehyd als auch Glutaraldehyd bilden inter- und intramolekulare kovalente Bindungen zwischen Aminogruppen aus. Glutaraldehyd bewirkt jedoch aufgrund seiner zwei Aldehydgruppen eine bessere Quervernetzung als Formaldehyd. Bei der Reaktion des bifunktionellen Glutaraldehyds mit Proteinen scheinen vernetzte Komplexe von Polymeren auf Pyridinbasis zu entstehen, die sowohl aus löslichen als auch aus an Membranen gebundenen Proteinen gebildet werden. Dies mag auch für den guten Erhaltungszustand der mit Glutaraldehyd fixierten Gewebe verantwortlich sein. Bei einer starken Quervernetzung bleiben zwar intrazelluläre Strukturen gut erhalten, die Antigenität wird jedoch mit zunehmendem Gehalt an Glutaraldehyd durch Blockierung der Epitope reduziert. Außerdem bewirkt es aufgrund der beiden funktionellen Gruppen bei Verwendung von UV-Auflicht-Anregung eine höhere Hintergrundfluoreszenz. Die Glutaraldehydkonzentration sollte daher bei Präparaten für die Immunofluoreszenz unter 1 % liegen. Formaldehyd dagegen besitzt nur eine Aldehydgruppe und kann aufgrund seines geringen Molekulargewichts gut in das Gewebe eindringen. Im Vergleich zur Fixierung mit Glutaraldehyd werden nicht so große, vernetzte Strukturen gebildet, und mehr Material wird ausgelaugt, insbesondere wenn die Fixierung über einen längeren Zeitraum erfolgt. Formaldehyd fixiert Lipide und Polysaccharide nicht gut. Diese nachteiligen Effekte können z.T. durch das schnelle Eindringen von Formaldehyd in die Probe aufgewogen werden (Flegler et.al., 1995). Für die Fixierung waren Glutaraldehydkonzentrationen von 0,2 %, 1% und 2,5 % mit Formaldehydkonzentrationen von 1 % und 4 % kombiniert worden. Konzentrationen von bis zu 4 % sind in der Regel für eine gute Fixierung zu empfehlen. Für die Wurzeln von *S. vernalis* erwies sich ein Fixativ mit einem Formaldehydgehalt von 1% in

Phosphatpuffer kombiniert mit einer Glutaraldehydkonzentration von 0,2 % als günstig. Höhere Konzentrationen an Glutaraldehyd oder eine alternativ durchgeführte Fällung des Proteins mit kaltem Aceton führten zu einem Verlust der Antigenität.

#### 3.3.1.2 Einbettung für die Lichtmikroskopie

Ein sehr wichtiger Punkt bei der Immunocyto-logie ist die Wahl des richtigen Einbettungsmaterials. Eine Methode stellt die Einbettung von Geweben in **Paraffin** dar. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß das Paraffin nach dem Schneiden wieder entfernt werden kann, so daß der Antikörper nicht nur an der Oberfläche des Gewebeschnittes bindet, sondern auch in das Gewebe eindringen kann und somit eine intensive Markierung erreicht wird. Nachteil dieser Methode ist zum einen, daß das Einbetten mit Paraffin über mehrere Tage bei 60 °C erfolgt, was zu einer Inaktivierung empfindlicher Antigene führen kann. Zum anderen sind die eingebetteten Gewebe in dem weißen Paraffin ohne vorherige Färbung (z.B. Gegenfärbung mit Toluidinblau, Eosin oder Safranin, Leitch et al., 1994) nur schwer zu erkennen, was Schwierigkeiten beim Schneiden der Proben verursachen kann. Zusammen mit einer FAA-Fixierung (s. Kap. 2.9.1) ist diese Art der Probenpräparation jedoch sehr gut für *in-situ*-Hybridisierungen geeignet. Für die Antikörperinkubationen wurden die Schnitte auf mit Polylysin beschichteten Objektträgern fixiert.

Ein viel verwendetes Produkt ist der von der Firma Heraeus Kulzer für die Immunologie angebotene **Kunststoff Technovit 8100** (Glycolmethacrylat). Für eine gute Antigenität ist hier zum einen eine geringe Polymerisationstemperatur und zum anderen ein guter Zugang zum Antigen verantwortlich. Als Nachteil bei diesem Kunststoff erwies sich jedoch die Notwendigkeit einer Auspolymerisation unter Luftabschluß. Dabei schwammen die sehr leichten Pflanzenteile immer wieder an die Oberfläche und mußten dann wieder neu ausgerichtet werden. Die Ausrichtung des Pflanzenmaterials erwies sich jedoch als schwierig, da zur Gewährleistung des Luftabschlusses die eingebetteten Pflanzenteile mit Folien abgedeckt werden mußten.

Bei dem **Kunststoff Technovit 7100** (Heraeus Kulzer) handelt es sich um ein 2-Hydroxyethyl-Methacrylat. Im Gegensatz zu Technovit 8100 ist dieser Kunststoff nicht speziell für die Immunohistologie entwickelt worden. Bei seiner Polymerisation steigt die Temperatur jedoch abhängig von der Menge des zu polymerisierenden Einbettmittels nicht über 40 °C, so daß es sich auch für die Immunohistologie eignet, sofern nicht sehr

temperaturempfindliche Antigene vorliegen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Polymerisation durch Luftsauerstoff nicht inhibiert wird. Da der Kunststoff Technovit 7100 im Vergleich mit den anderen Materialien eine schnelle Einbettung mit gutem Erhalt der Antigenität ermöglichte, wurde er bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen (FITC- und Immunogold-Markierung mit silver-enhancement, s. Kap. 3.3.1) eingesetzt.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Kunststoffschnitte wurden positiv geladene Objektträger (Roth, Menzel) verwendet, die sich als besonders geeignet herausstellten, da die Schnitte auf ihnen gut hafteten. Da für die Antikörpermarkierungen nur mit geringen Volumina inkubiert wurde, war es vorteilhaft, die Schnitte entweder unter einem Deckglas oder auf Objektträgern zu inkubieren, die mit Ausnahme von kleinen runden Feldern eine hydrophobe Beschichtung aufwiesen. Somit blieben die aufgetragenen Flüssigkeiten als Tropfen direkt über dem Schnitt, ohne sich über den Objektträger zu verteilen. Das ermöglichte den Einsatz sehr kleiner Volumina an primärem und sekundären Antikörper bei den Inkubationen.

#### 3.3.1.3 Einbettung für die Elektronenmikroskopie

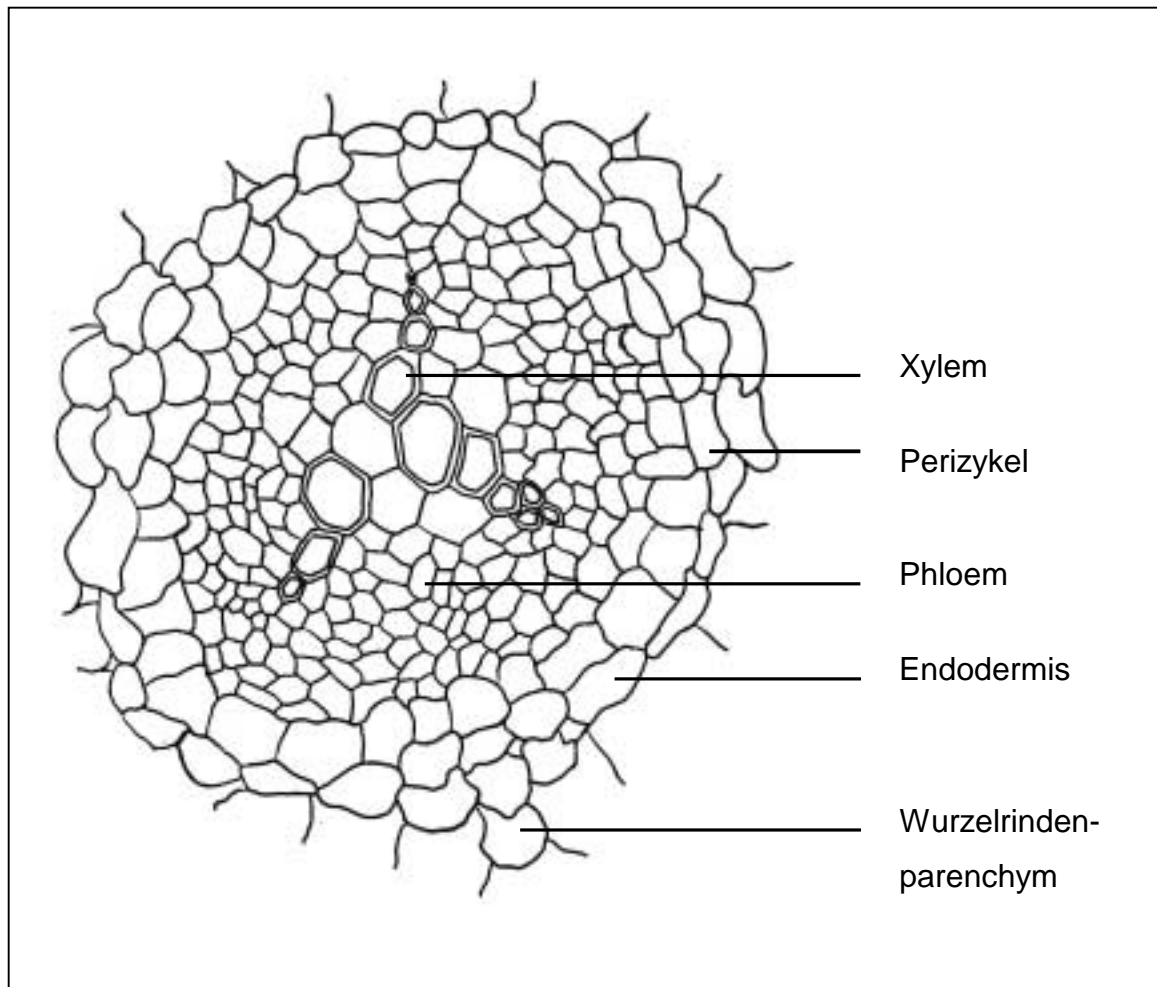
Sollen die Präparate auch mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) untersucht werden, werden an den Kunststoff wiederum andere Anforderungen gestellt. Sowohl für die Licht- als auch für die Elektronenmikroskopie als geeignet erwies sich der **Kunststoff Unicryl** (Plano). Aus finanziellen Gründen wurde dieses sehr teure Harz vorwiegend bei TEM-Untersuchungen eingesetzt. Das Harz weist zum einen eine für das TEM ausreichende Stabilität auf und die Antigen-Eigenschaften bleiben weitgehend erhalten. Des weiteren wird beim Schneiden die Schnittfläche von der Kante des Messers aufgerauht, so daß größere Gewebebereiche an der Oberfläche freiliegen und somit die Sensitivität bei immunologischen Untersuchungen erhöht wird.

Nachdem von den fertigen Präparaten mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms etwa 80 nm dicke Schnitte für die TEM-Untersuchungen mit einem Ultramikrotom angefertigt wurden, wurden diese auf beschichtete Nickelgrids aufgezogen.

### 3.3.2 Zelluläre Lokalisation der HSS in *S. vernalis*-Wurzeln

Da sowohl der Northern-Blot als auch die RT-PCR ergeben hatten, daß die HSS nur in den Wurzeln von *S. vernalis* vorkommt (s. Kap. 3.2.1.3), wurden ausschließlich Wurzeln

unterschiedlichen Alters für die Lokalisation eingebettet und für die Markierungen verwendet.



**Abb. 3.18:** Schema des zentralen Bereiches eines Wurzelquerschnitts von *S. vernalis* mit einem triarchen Leitbündel

In Abb. 3.18 ist schematisch der Zentralzylinder mit angrenzender Endodermis und Rindenzellen einer jungen Wurzel von *S. vernalis* dargestellt. Da es sich bei *S. vernalis* um eine einjährige Pflanze handelt, findet man viele Wurzeln im primären Stadium. Der Zentralzylinder umfaßt als äußere Begrenzung den einschichtigen Perizykel, der die radiär symmetrisch angelegten Siebteile und das dreistrahliges Xylem umgibt. Nach außen folgt die ebenfalls einschichtige Endodermis, als innerste Rindenschicht. Sie bildet das innere Abschlußgewebe der Wurzelrinde. In den radiären Wänden der Endodermis ist der Casparysche Streifen zu sehen, der aus einer suberinähnlichen, lipophilen Substanz besteht. Hierdurch wird der von der Pflanze nicht kontrollierbare, aufgrund von Kapillarkräften erfolgende, apoplastische Transport vom

Rindenbereich in den Zentralzylinder unterbrochen. Für eine Aufnahme in den Zentralzylinder müssen Ionen über das Plasmalemma aufgenommen und intrazellulär transportiert werden. Die Endodermis stellt somit eine selektive und kontrollierte Aufnahme von Nährsalzen sicher. An die Endodermis grenzen nach außen die Zellen des Wurzelrindenparenchyms an, die durch das Vorkommen von Interzellularen gekennzeichnet sind. Typisch für die Wurzeln von *S. vernalis* ist das triarche Leitbündel, mit seinen drei Xylemstrahlen, zwischen denen das Phloem angeordnet ist.

**Abb. 3.19** (s. folgende Seite): FITC-markierte HSS in einem Wurzelquerschnitt von *S. vernalis* (eingebettet in Technovit 7100, Schnittdicke 4 µm); ➤-Casparischer Streifen, **Co**-Cortexzelle (Rindenparenchym) , **Pc**-Perizykel, **Ph**-Phloem, **Xy**-Xylem

**A** FITC-Markierung der HSS in Gruppen spezifischer Zellen der Endodermis und des Rindenparenchyms jeweils gegenüber dem Phloem

Kontrollversuch durch Inkubation mit:

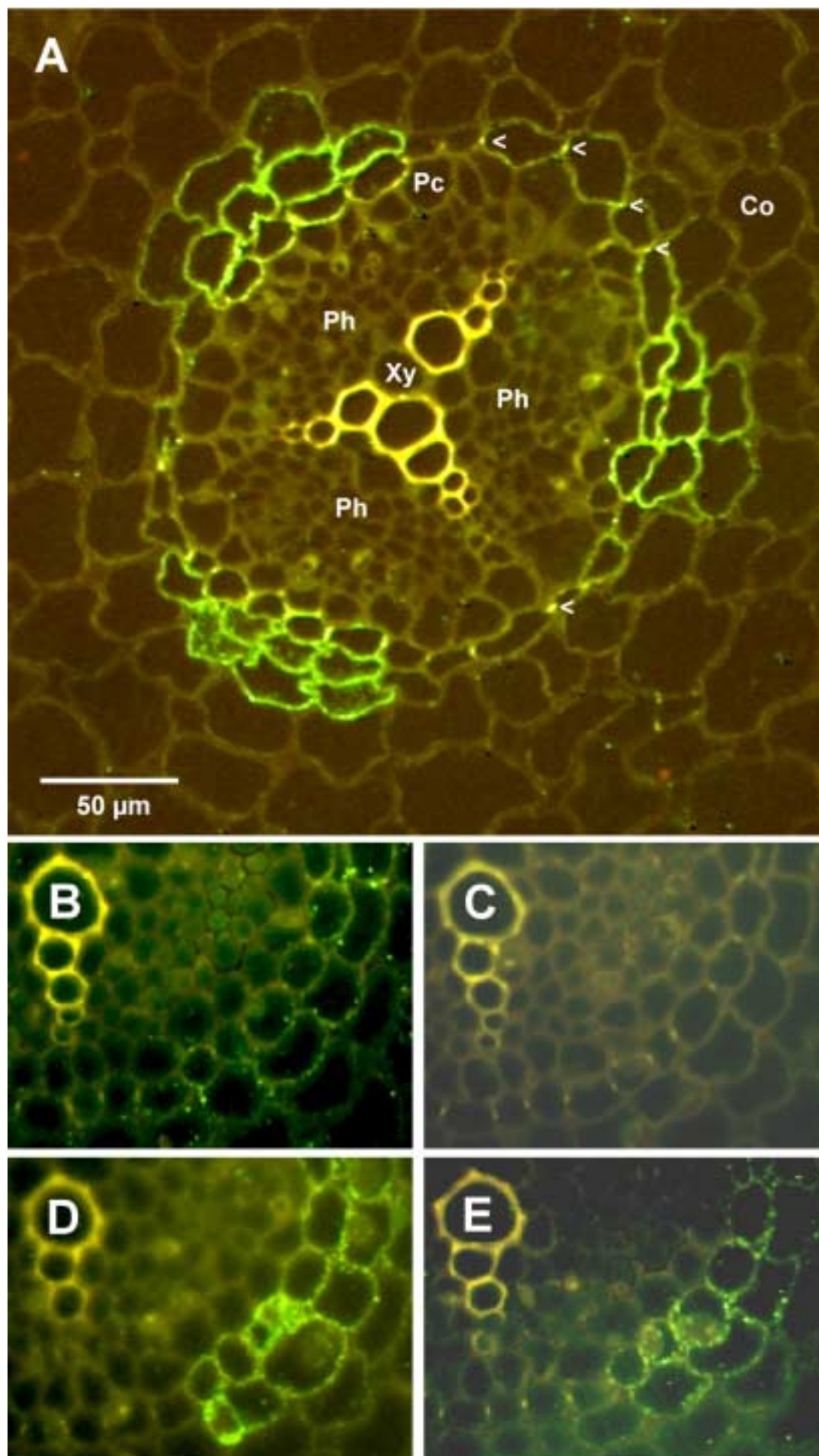
**B** HSS-Protein (Protein in dreifacher IgG-Konzentration)

**C** HSS-Protein (Protein in einem Zehntel der IgG-Konzentration)

**D** DHS-Protein (Protein in dreifacher IgG-Konzentration)

**E** DHS-Protein (Protein in einem Zehntel der IgG-Konzentration)

**F** ausschließlich sekundärem Antikörper

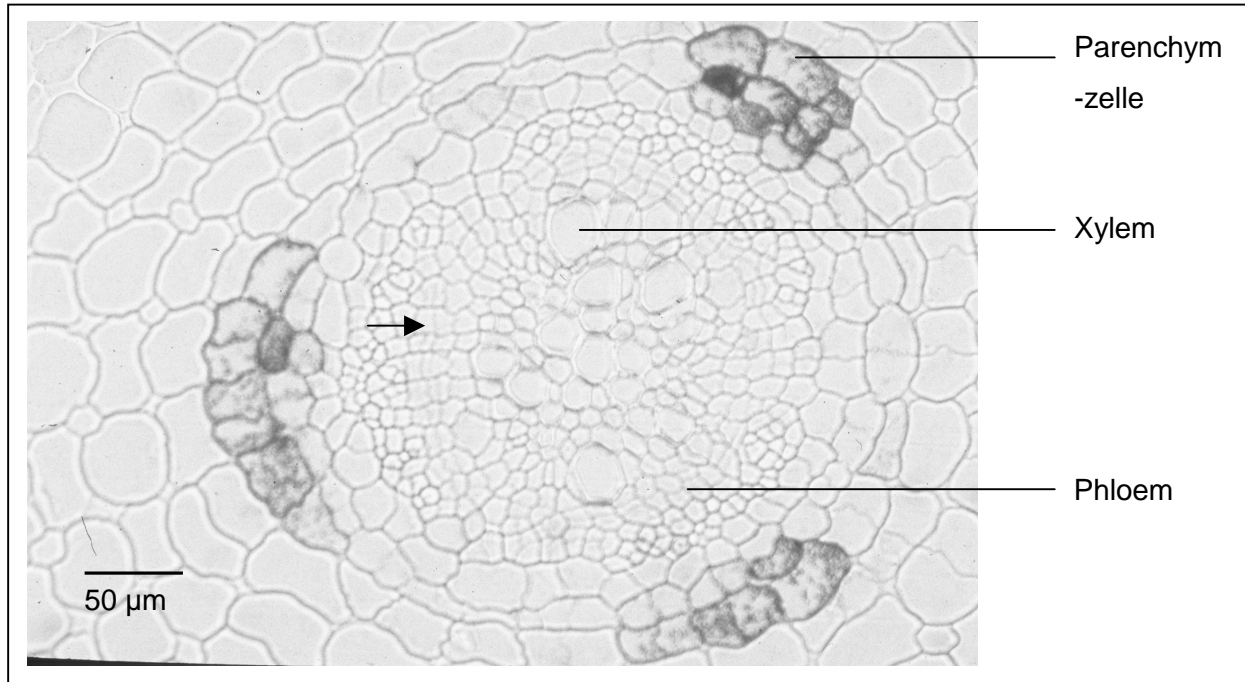


Für die Lokalisation der HSS in *S. vernalis* wurden zwei verschiedene Markierungsmethoden eingesetzt. Nachdem unspezifische Bindungsstellen abgeblockt worden waren, wurden die Gewebeschnitte mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS mindestens 1h inkubiert (s. Kap. 2.9.2). Der sekundäre Antikörper war entweder mit Fluresceinisothiocyanat (FITC) oder aber mit Goldpartikeln konjugiert.

Die Markierungen mit dem **FITC-konjugierten Antikörper** (s. Abb. 3.19 A-F) zeigen, daß die HSS nur in der Endodermis und nach außen in einigen angrenzenden Zellen des Rindenparenchyms vorkommt. Die Anzahl der markierten Endodermiszellen liegt zwischen drei und vier, die der Cortexzellen bei vier bis sechs. Die Zellen des Perizykels wiesen dagegen keine Markierung auf. Auffällig ist hierbei, daß das Vorkommen der HSS auf drei distinkte Zellgruppen beschränkt ist, die jeweils direkt vor dem Phloem liegen. Die Bereiche vor dem Xylem bleiben dagegen ausgespart. Das Xylem zeigte bei der verwendeten Anregungsstrahlung von 495 nm eine starke Autofluoreszenz, die sich jedoch mit ihrer gelben Farbe von den grün fluoreszierenden Markierungen deutlich unterscheidet. Aufgrund des ebenfalls eine starke Autofluoreszenz zeigenden Casparyschen Streifens konnte die Endodermis gut identifiziert werden und diente zur Orientierung im Gewebe.

Wegen der nicht auszuschließenden Kreuzreaktivität des HSS- und DHS-spezifischen Antikörpers, die bereits durch Western-Blots nachgewiesen worden war (s. Kap. 3.2.2.4), wurden bei der Lokalisation der HSS zwei Kontrollversuche durchgeführt. Wurde der HSS-Antikörper mit HSS-Protein zusammen vorinkubiert und erst danach zur Markierung eingesetzt, so zeigte sich bereits bei der niedrigeren HSS-Proteinkonzentration (ein Zehntel der eingesetzten Antikörperkonzentration) eine Abschwächung der Markierung (s. Abb. 3.19 C), bei der höheren Konzentration (das Dreifache der eingesetzten Antikörperkonzentration) fehlte die Markierung dagegen ganz (s. Abb. 3.19 B). Bei der Inkubation des HSS-Antikörpers mit gleichen Mengen DHS wurde für keine der gewählten Konzentrationen eine Abschwächung der Markierung beobachtet (s. Abb. 3.19 D+E). Hieraus kann man schließen, daß die Markierung tatsächlich auf der Bindung des HSS-Antikörpers an die HSS beruht. Eine Kreuzreaktivität mit im Gewebe befindlicher DHS kann deshalb sicher ausgeschlossen werden.





**Abb. 3.20:** Gold-Markierung mit silver-enhancement (*S. vernalis* Wurzelquerschnitt 4 µm, eingebettet in Unicryl). Der Pfeil kennzeichnet einen Bereich mit einsetzender Kambiumtätigkeit.

Durch die zweite Markierungsmethode, die **Immunogoldmarkierung mit anschließendem silver-enhancement**, konnten die Ergebnisse der FITC-Markierungen bestätigt werden. Auch hier zeigte sich das isolierte Vorkommen der HSS in bestimmten Zellgruppen der Wurzelrinde direkt gegenüber dem Phloem. Obwohl in Abb. 3.20 die triarche Struktur des Leitbündels aufgrund des beginnenden sekundären Dickenwachstums nicht klar zu erkennen ist, sind auch hier drei Gruppen von Zellen in der Endodermis und der Cortex zu erkennen, die eine Markierung aufwiesen. Der Zustand des beginnenden sekundären Dickenwachstums zeigt sich besonders deutlich an den infolge der Kambiumtätigkeit erkennbaren parallelen Zellreihen (s. Abb. 3.20 Pfeil).

Vergleicht man die beiden Markierungsmethoden miteinander, so ist hervorzuheben, daß bei der Immunogoldmarkierung mit anschließendem silver-enhancement die Markierungsstärke sehr stark von der Inkubationszeit mit dem Silberreagenz abhing. Mit zunehmender Inkubationszeit trat jedoch durch unspezifische Ablagerung elementaren Silbers eine Schwärzung über den gesamten Querschnitt verteilt auf, so daß der Zeitpunkt bis zu einer ausreichenden Markierung genau abgepaßt werden mußte. Die spezifische Schwärzung durch die Anlagerung von elementarem Silber an die Goldpartikel des sekundären Antikörpers war hier oft nur schwer zu erkennen. Da das Antigen nur in einem schmalen wandständigen Plasmasaum auftrat, konnte die



Markierung von der ebenfalls dunklen Zellwand kaum unterschieden werden. Auch bei der FITC-Markierung ist der markierte Plasmasaum bedingt durch die große Vakuole sehr schmal. Da hierbei jedoch die Markierungsintensität nicht so stark von der Inkubationszeit abhängig ist, traten weniger unspezifische Markierungen auf. Dies beruht auf der Tatsache, daß es sich bei der FITC-Markierung um spezifische Antikörper-Wechselwirkungen handelt, während es sich beim silver-enhancement um unspezifische Metallablagerungen handelt. Außerdem war der Kontrast durch die grün fluoreszierende Farbe stärker. Aufgrund der nur auf einen schmalen Bereich beschränkten Markierung mußte bei mit FITC markierten Gewebeschnitten mit relativ lichtstarken Objektiven bei ausreichender Vergrößerung (40fache Vergrößerung) mikroskopiert werden. Dabei wird das Licht stärker gebündelt, so daß die Anregung punktueller erfolgt. Auf der anderen Seite wurde der Bildausschnitt bei dieser Vergrößerung so klein, daß der gesamte Zentralzylinder nicht mehr auf ein Foto paßte. Daher wurde von jedem Wurzelquerschnitt die obere und die untere Hälfte getrennt fotografiert bzw. Teile der Dokumentation am IPB in Halle mit freundlicher Unterstützung von Dr. Bettina Hause durchgeführt.

Die Lokalisation der DHS konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden nur Querschnitte der Wurzel von *S. vernalis* untersucht, da dort bei der RT-PCR sehr starke Signale auftraten (s. Kap. 3.2.1.2). In der Wurzel traten bei den gewählten Antikörperkonzentrationen von 1:60 bzw. 1:30 ( $OD_{280}$  des unverdünnten Antikörpers betrug 0,61) nur unspezifische Markierungen auf. Belegt wird dies durch vergleichende Untersuchungen mit dem Präimmunserum (1:30 und 1:100 verdünnt), die die gleichen Markierungen aufwiesen.

Für die Arbeiten mit *N. tabacum* wurde auch der DHS-Antikörper aus *S. vernalis* verwendet, da er im Western-Blot die gleiche Affinität zu der DHS aus *N. tabacum* gezeigt hatte (s. Kap. 3.2.2.4). Es wurden Querschnitte verschiedener Organe (Blatt, Fruchtknoten) von *N. tabacum* mit dem DHS-Antikörper aus *S. vernalis* inkubiert. Im Blatt traten bei den Antikörperverdünnungen von 1:30 bzw. 1:60 nur unspezifische Signale in den Chloroplasten auf. Wurde der HSS-Antikörper mit gleichem  $OD_{280}$ -Wert als Negativkontrolle eingesetzt, traten ebenfalls Markierungen der Chloroplasten auf. Da *N. tabacum* jedoch keine HSS besitzt, müssen die Markierungen unspezifisch sein oder es handelt sich hierbei um eine Kreuzreaktion zwischen dem SvHSS-Ak und der DHS. Beim Fruchtknotengewebe traten Markierungen bei einer Konzentration von 1:20 im Bereich der Samenanlagen auf. Eine vergleichbare Inkubation mit Präimmunserum

zeigte jedoch ähnliche Markierungen, so daß auch diese als unspezifisch angesehen werden müssen. Western-Blots (s. Kap. 3.2.2.4) haben gezeigt, daß der DHS-Antikörper verglichen mit dem HSS-Antikörper eine geringere Empfindlichkeit aufwies, so daß ein Unterschied in der Antikörper-Antigen-Affinität möglicherweise für den fehlenden immunocytologischen Nachweis der DHS in *N. tabacum* verantwortlich ist.

Obwohl die DHS aus jungen Tabakblättern kloniert werden konnte (Ober & Hartmann, 1999a), ist es bisher noch nicht gelungen die DHS mit einem Aktivitätstest in Geweben von *N. tabacum* nachzuweisen. Gemäß der Expressionsanalyse (Northern-Blot und RT-PCR s. Kap. 3.2.1.3) kommt die DHS offensichtlich ubiquitär in allen Pflanzenorganen vor, jedoch nur in geringen Konzentrationen infolge geringer Expression im Vergleich zur Expression der HSS in der Wurzel. Möglicherweise liegt die DHS über das Gewebe verteilt vor während die HSS nur in wenigen Zellen in hoher Konzentration vorkommt.

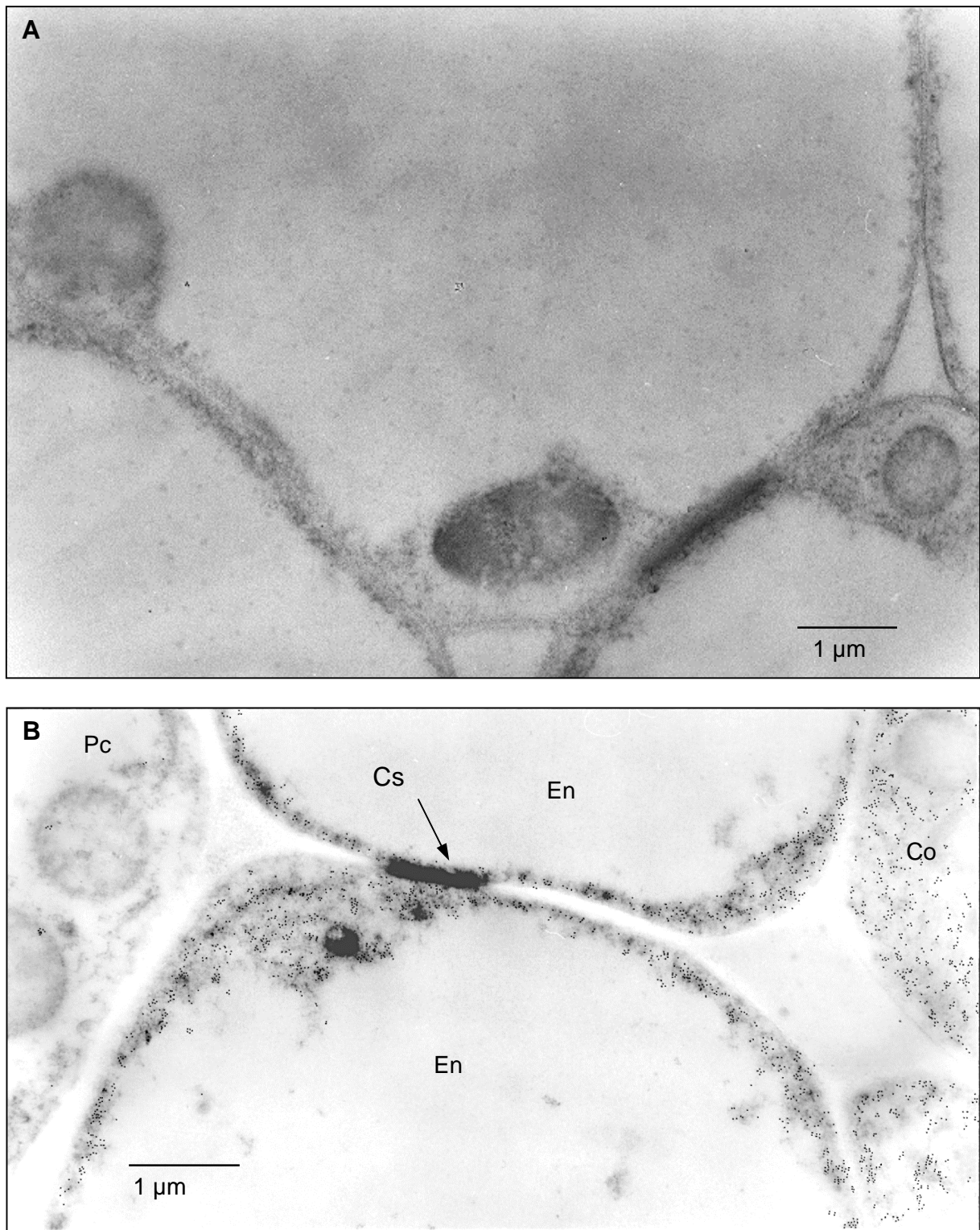
Die Inkubation von Wurzelquerschnitten mit dem Präimmunserum dient normalerweise im Vergleich zu der Inkubation mit dem Hauptserum in gleicher Verdünnung als Spezifitätsnachweis für die Markierung mit dem Antikörper. In der vorliegenden Arbeit ist bei beiden Markierungsmethoden (FITC und Immunogold mit silver-enhancement) mit dem Hauptserum weder in den verschiedenen Verdünnungen noch unverdünnt eine spezifische Markierung gelungen. Bei zunehmender Konzentration der Seren traten sehr starke unspezifische Hintergrundmarkierungen auf. Die Spezifität des SvHSS-Ak konnte aber durch die Affinitätsreinigung sichergestellt werden. Dies wird durch den Western-Blot (s. Abb. 3.15) und die Markierungsunterfütterungen belegt (s. Abb. 3.19).

### 3.3.3 Subzelluläre Lokalisation der HSS durch Immunogoldmarkierung

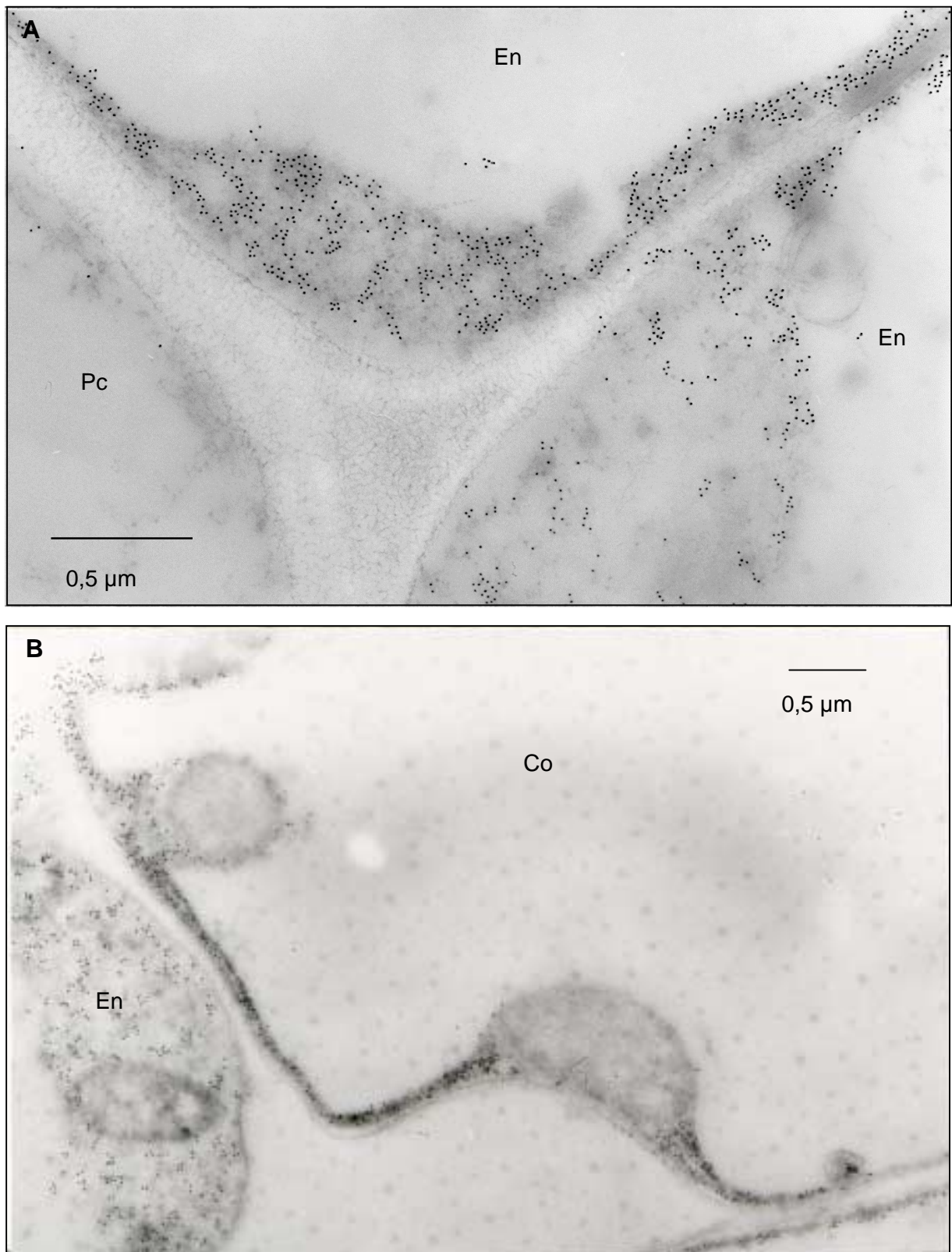
Erste Versuche zur *in-situ*-Lokalisation der HSS in der Wurzel von *S. vernalis* auf zellulärer Ebene waren bereits in der Arbeit von Ober (1997) erfolgt. Hierbei war jedoch ein Antikörper gegen die HSS aus *R. viridis* eingesetzt worden, der eine scheinbar spezifische Markierung in den kristallartigen Einschlüssen der Microbodies zeigte. Später konnte jedoch gezeigt werden, daß der Antikörper gegen die bakterielle HSS nicht die pflanzliche HSS erkannte, was der mittlerweile vorliegende Vergleich der Aminosäuresequenz beider Enzyme auch bestätigt. In weiteren Vorversuchen wurde bereits der gegen die HSS aus *S. vernalis* generierte Antikörper verwendet. Die hieraus

resultierenden Ergebnisse legten zum ersten Mal eine mögliche Lokalisation der HSS in der Endodermis nahe (Ober, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die in dieser Arbeit durchgeführte **Immunogoldmarkierung** mit Hilfe des affinitätsgereinigten, für die HSS aus *S. vernalis* spezifischen Antikörpers und die anschließende Dokumentation am TEM ergab, daß die HSS ausschließlich im Cytosol von bestimmten Endodermiszellen bzw. Rindenparenchymzellen vorkommt (s. Abb. 3.21 B), sämtliche Organellen blieben unmarkiert (s. Abb. 3.22 B). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß das Vorkommen des Enzyms auf Endodermiszellen beschränkt ist, die direkt vor dem Phloem liegen. An dem inselartigen Auftreten der HSS sind allerdings nie Zellen des Perizykels (s. Abb. 3.21 B und Abb. 3.22 A) beteiligt. Die Inkubation mit dem Präimmunserum diente als Kontrolle (s. Abb. 3.21 A), ob es sich bei den Markierungen nicht um unspezifische Immunantworten handelt.



**Abb. 3.21:** TEM-Aufnahmen eines Wurzelquerschnitts von *S. vernalis* (Schnittdicke ca. 80 nm) mit Immunogoldmarkierung, Endodermis (**En**), Perizykel (**Pc**), Casparyscher Streifen (**Cs**), Rindenparenchymzelle (Cortex, **Co**); **A** Zellen der Endodermis, Inkubation mit Präimmunserum (1:500 verd.) **B** Übersicht mit Perizykelzelle, Endodermis mit Casparyschem Streifen und Cortexzellen



**Abb. 3.22:** TEM-Aufnahmen eines Wurzelquerschnitts von *S. vernalis* (Schnittdicke ca. 80 nm) mit Immunogoldmarkierung, Endodermis (**En**), Perizykel (**PC**), Casparyscher Streifen (**Cs**), Rindenparenchymzelle (Cortex, **Co**); **A** Detail mit zwei Endodermiszellen und angrenzender Perizykelzelle; **B** Zelle des Rindenparenchyms und Endodermiszellen mit unmarkierten Organellen



Eine Betrachtung der HSS-enthaltenden sowie der daran angrenzenden Zellen der Wurzeln, die in Araldit eingebettet worden waren, zeigten im TEM keine strukturellen Besonderheiten. Da die Pyrrolizidinalkaloide im Phloem transportiert werden, ihre Synthese aber zumindest zum Teil im Rindenparenchym und in der Endodermis erfolgt, war eine möglicherweise erhöhte Anzahl von Plasmodesmen in den Zellen mit einer HSS-Markierung bzw. der daran angrenzenden Zellen vermutet worden. Über diese Plasmodesmen hätte der Transport von PAs oder eventueller Zwischenprodukte in Richtung Phloem erfolgen können.

### **3.3.4 Lokalisation der DHS mit Hilfe eines GUS-Reportersystems**

Da die Lokalisation der DHS bisher mit immunologischen Methoden nicht erfolgen konnte (s. Kap. 3.3.2), wurde ein GUS/GFP-Fusionsgen eingesetzt, das mit dem DHS-Promotor aus Tabak gekoppelt ist, um Tabakpflanzen mit Hilfe von Agrobakterien zu transformieren. An den Stellen, an denen die DHS exprimiert, also der DHS-Promotor aktiviert wird, wird in diesen Pflanzen das GUS-GFP-Fusionsprotein exprimiert. Nach Inkubation der Pflanzen in der entsprechenden Substratlösung ist eine Blaufärbung infolge der Glucuronidase-Aktivität des GUS-Genproduktes sichtbar. Ersten Untersuchungen zur Folge trat in allen Geweben eine schwache, aber deutliche Blaufärbung auf. Eine stärkere Blaufärbung trat in bestimmten Wurzelbereichen auf. Für eine genauere Lokalisation muß die Methode der Fixierung noch optimiert werden. Neben der Vermeidung des Austretens des durch  $\beta$ -Glucuronidase Spaltung entstehenden blauen Farbstoffs durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat (II) und Kaliumhexacyanoferrat (III) bei der Fixierung, spielt auch die Präfixierung mit 90 %igen eiskalten Aceton (Sessions et al. 1999) oder eiskaltem 0,3 %igem Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (Pichon et al, 1992) eine Rolle.

Mit Hilfe dieser Methode sollen nun zunächst die Gewebebereiche in der Tabakpflanze identifiziert werden, in denen eine Expression der DHS erfolgt. Diese Gewebe sollen anschließend mit immunohistologischen Lokalisationsmethoden genauer untersucht werden. Erste transgene Tabakpflanzen stehen bereits zur Verfügung und werden untersucht.

## 4 Diskussion

Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel zeichnet sich durch seine große chemische Diversität und durch seine hohe Spezifität aus, die durch spezifische Enzyme vermittelt wird. Die Gene, die die daran beteiligten hochspezifischen Enzyme codieren, müssen nach der derzeitigen Vorstellung aus dem ubiquitären Primärstoffwechsel durch Genduplikation und funktionelle Optimierung oder Anpassung entstanden sein. Treibende Kraft für die Etablierung der duplizierten Gene im Sekundärstoffwechsel ist der Selektionsdruck, der die Pflanze umgebenden Umwelt. Eine der wenigen bisher bekannten Beispiele ist die Abstammung der HSS (Schlüsselenzym der PA-Biosynthese) von der DHS (beteiligt an der Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A) durch Genduplikation (s. Kap. 1.3).

Eine Sequenzanalyse der cDNA von HSS und DHS aus *S. vernalis* hatte ergeben, daß die HSS als ein Enzym des Sekundärstoffwechsels aus der DHS, einem Enzym des Primärstoffwechsels hervorgegangen ist (Ober & Hartmann, 1999b). Für die nahe Verwandtschaft der beiden Enzyme sprechen die hohen Homologien von 79 % auf Aminosäure- und 83 % auf Nukleinsäureebene sowie große Übereinstimmungen in den kinetischen Daten (Ober & Hartmann, 1999b). Daraus läßt sich schließen, daß das Gen für die HSS aus dem konservativen DHS-Gen durch Genduplikation hervorgegangen ist.

### 4.1 Vergleich der genomischen Organisation der HSS und DHS aus *S. vernalis*

Von den beiden Genen für die HSS bzw. DHS wurden die Intron-Exon-Struktur untersucht, ob sich die nahe Verwandtschaft der beiden Enzyme auch in den genomischen Strukturen widerspiegelt. Für diese Untersuchungen über den Ursprung der HSS wurde durch PCR-Amplifikation, Isolierung und Sequenzierung die genomische Organisation der Introns von HSS und DHS aus *S. vernalis* ermittelt. Hierbei stellte sich heraus, daß beide Gene je fünf Introns enthalten, die sich in Länge und Sequenz unterscheiden. Die Lage der homologen Exons stimmt jedoch exakt überein. Die Intronpositionen sind also konserviert ebenso wie die Intronphasen. Es kann jedoch auch zum Ausfall von Introns kommen, so daß zwei Exons direkt

nebeneinander liegen. Die Gene zeigen somit nicht nur auf cDNA- (Ober & Hartmann, 2000) sondern auch auf genomischer Ebene eine sehr ähnliche Struktur. Bestätigt wird dies auch durch den Vergleich der genomischen Struktur des *hss*-und *dhs*-Gens aus *S. vernalis* mit *dhs*-Genen anderer Organismen (*A. thaliana*, *D. melanogaster*). Beide Gene weisen somit ein generelles Phänomen verwandter Gene auf, für die es typisch ist, daß die Lage zumindest einiger Introns konserviert ist. Die Länge der Introns hingegen ist nicht konserviert, so daß die Länge der Gene primär durch die Länge der Introns bestimmt wird (Lewin, 2000). Untersuchungen von Gierl und Frey (2001) belegen anhand der Benzoxazinon-Biosynthese und Indol-Produktion in Mais ebenfalls die Rekrutierung von Sekundärstoffwechselenzymen aus dem Primärstoffwechsel. Zwei Lyasen, die Indol-3-glycerinphosphat in Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat spalten, leiten sich hierbei von einer Tryptophansynthase des Primärstoffwechsels ab. Die Exon-Intron-Struktur der beiden Sekundärstoffwechselenzyme zeigt verglichen mit der einer Tryptophansynthase aus *A. thaliana* eine hohe Konserviertheit. Ein weiteres Beispiel für eine hoch konservierte Genstruktur stellen die Myrosinase und  $\alpha$ - $\beta$ -Glucosidasen dar. Ein Vergleich der Intron-Exon-Struktur der entsprechenden Gene aus verschiedenen Pflanzen zeigt auch hier große Übereinstimmungen (Rask, et al., 2000).

Des weiteren wurden mit Hilfe von Southern-Blots Hinweise auf die Anzahl der für die Enzyme codierenden Gene erhalten. Die Sequenzanalyse der cDNA der HSS zeigte für die untersuchten cDNA-Klone unterschiedliche ORFs, die sich hauptsächlich in der dritten Codonposition unterschieden (Ober & Hartmann, 1999b). Diese Tatsache spricht dafür, daß mehr als ein Gen für die HSS in Wurzeln von *S. vernalis* exprimiert wird. Belegt wird dies auch durch die vorliegende Arbeit, in der Southern-Blots mit genomischer DNA aus *S. vernalis* für die HSS mehrere Hybridisierungsbanden zeigten. Die Anzahl der Banden nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNA aus *S. vernalis* und Hybridisierung mit einer *dhs* spezifischen Sonde hingegen deutet auf nur ein *dhs*-Gen hin. Dies deckt sich mit Datenbankrecherchen, die ergeben haben, daß die DHS bei *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* ebenfalls nur ein "single copy" Gen ist.



## 4.2 Lokalisation von HSS und DHS

### 4.2.1 Bewertung der polyklonalen Antikörper gegen die HSS (SvHSS-Ak) bzw. DHS (SvDHS-Ak) aus *S. vernalis*

Nachdem durch Klonierung, Expression und Reinigung genügend rekombinante HSS bzw. DHS aus *S. vernalis* zur Verfügung stand (Ober & Hartmann, 1999b), waren die Voraussetzungen geschaffen, um die für die immunologische Lokalisation notwendigen polyklonalen Antikörper in Kaninchen zu erzeugen. Für die Lokalisation der HSS und DHS in Gewebeschnitten von *S. vernalis* war es notwendig die polyklonalen Antikörper gegen die beiden Enzyme mittels einer Affinitätschromatographie aufzureinigen, da aufgrund der hohen Homologie der beiden Enzyme von 79 % auf Aminosäureebene eine Kreuzreaktivität nicht ausgeschlossen werden konnte bzw. durch Western-Blots belegt wurde (s. Kap. 3.2.2.4). Der affinitätsgereinigte SvHSS-Ak erkannte tatsächlich bis zu einer Konzentration von 50 ng die DHS und umgekehrt zeigte der affinitätsgereinigte SvDHS-Ak sogar noch bis zu einer Konzentration von 10 ng HSS-Protein ein Signal. Insgesamt wies der SvDHS-Ak gegenüber der DHS eine geringere Antigenität auf als der SvHSS-Ak gegenüber der HSS. Aufgrund dieser Tatsachen war es notwendig eine Kreuzreaktivität der beiden Antikörper durch *in-situ*-Versuche auszuschließen, die eindeutig belegt haben, daß der SvHSS-Ak für die HSS hochspezifisch ist und im Gewebe nicht mit der DHS kreuzreagiert (s. Kap. 4.2.3).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß der SvHSS-Ak nur die pflanzliche HSS erkennt und nicht die bakterielle. In der Arbeit von Ober (1997) war umgekehrt gezeigt worden, daß der Antikörper gegen die bakterielle HSS die pflanzliche HSS nicht erkennt. Dies deckt sich mit der geringen Homologie der pflanzlichen mit der bakteriellen HSS auf Nukleinsäureebene (Ober & Hartmann, 1999b).

Innerhalb der Gattung *Senecio* haben Western-Blots mit der HSS aus *S. jacobaea* und dem SvHSS-Ak nur schwache Antikörpersignale gezeigt. Die HSS der mit *S. vernalis* näher verwandten *S. vulgaris* hingegen zeigt nur ein geringfügig schwächeres Signal als die HSS aus *S. vernalis* (Ober, unveröffentlichte Ergebnisse, Kadereit, 1984).

#### 4.2.2 Vergleich der Expressionsmuster von *hss* und *dhs*

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Lokalisation der Expression der Homospermidinsynthase (HSS) und der Desoxyhypusinsynthase (DHS) in *S. vernalis* und *N. tabacum* eingesetzt und miteinander verglichen. Die hohe Homologie zwischen der HSS und der DHS von 83 % auf Nukleinsäureebene stellte bezüglich der Kreuzreaktivität kein Problem dar wie durch Northern-Blots belegt werden konnte.

Mit Hilfe von Northern-Blots wurden die Expressionsmuster der beiden Enzyme in Tabak und *S. vernalis* miteinander verglichen. Das *dhs* Gen wird offensichtlich bei beiden Pflanzen in allen untersuchten Organen exprimiert, mit einer leicht höheren Expression in den Wurzeln. Das Gen für die HSS wird hingegen nur in den Wurzeln von *S. vernalis* exprimiert. Da es sich bei den Sonden für den Northern-Blot um mit der PCR erzeugte cDNA-Sonden handelte, wurde ergänzend eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt, um eine Kreuzhybridisierung der Sonden für die *dhs* bzw. *hss* mit dem jeweils anderen Protein auszuschließen. Durch die RT-PCR konnten die Ergebnisse des Northern-Blots bestätigt werden. Die RT-PCR hat den Vorteil, daß sie zum einen aufgrund der auf die Sequenzunterschiede zwischen HSS und DHS ausgerichteten Primer eine höhere Spezifität und zum anderen aufgrund der exponentiellen Amplifizierung eine höhere Empfindlichkeit als der Northern-Blot aufweist. Eine Quantifizierung allein über die RT-PCR sollte jedoch aus den bereits aufgeführten Gründen (s. Kap. 3.2.1.2) nicht vorgenommen werden. Sowohl der Northern-Blot als auch die RT-PCR deuten jedoch eine etwas höhere Expression des *dhs* Gens in den Wurzeln von *S. vernalis* an. Eine Absicherung der Ergebnisse müsste allerdings noch mit Hilfe einer internen Kontrolle erfolgen, die mit der Ziel-Sequenz koamplifiziert wird. Eine Möglichkeit hierfür bestände in einer sogenannten "multiplex-competitive-PCR". Hierbei werden zwei native cDNAs (Ziel- und "housekeeping" -Gen) zusammen mit zwei mutierten zu der jeweiligen nativen cDNA kompetitiven Templates zusammen in einem Ansatz amplifiziert (Apostolakos et al., 1993). Die Konzentration des kompetitiven Templates ist dabei bekannt. Voraussetzung ist allerdings, daß die Sequenz des entsprechenden "housekeeping-Gens" aus *S. vernalis* (z.B. GAPDH) vorliegt. Eine sehr elegante Methode, um PCR-Produkte im folgenden zu quantifizieren, stellt die Analyse mit Hilfe der "Real-time-PCR" dar. Während der PCR-Reaktion wird in das gebildete PCR-Produkt ein fluoreszierender Farbstoff eingelagert und die Fluoreszenz gemessen.

Das ansteigende Fluoreszenzsignal korreliert mit der Menge des Templates am Beginn der PCR.

*N. tabacum* und *S. vernalis* sind die ersten beiden Pflanzen, in denen das Vorkommen der DHS und dessen Beteiligung an der Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A) nachgewiesen werden konnte (Ober & Hartmann, 1999a, b). Über die Lokalisation und Funktion des Enzyms in Pflanzen ist bisher allerdings nichts bekannt. Nur über das eIF5a sind einige wenige Informationen verfügbar. Pay et al. (1991) konnten die erste pflanzliche eIF5A cDNA aus *Medicago sativa* klonieren. Später konnten Mehta et al. (1994) beweisen, daß in Zellkulturen von Mais ein spezifischer Lysinrest des eIF5A postranslational zu Desoxyhypusin modifiziert wird. Bei der Verwendung von DNA-Sonden gegen eIF5A aus *Dictyostelium discoideum* konnten zwei cDNA-Sequenzen für das eIF5A aus *Nicotiana plumbaginifolia* isoliert werden. Das eine der entsprechenden Gene wird konstitutiv in allen untersuchten Geweben exprimiert, während das andere hauptsächlich in photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert zu werden scheint (Chamot & Kuhlemeier, 1992). In Mais wird der eIF5A ebenfalls in allen Geweben ohne eine Korrelation der Genexpression mit der Zellteilungsaktivität konstitutiv exprimiert (Dresselhaus et al, 1999). Erhöhte Mengen an DHS-Transkripten in den Fruchtknoten, wie es beim Mais für mRNA des eIF5A nachgewiesen wurde (Dresselhaus et al, 1999), konnte in der vorliegenden Arbeit für den Tabak nicht bestätigt werden. Die RT-PCR zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Fruchtknotenstadien. Die Expressionsstärke des *dhs*-Gens ist in allen untersuchten Geweben der Tabakblüte annähernd gleich. Untersuchungen von Anke & Ober (unveröffentlicht) belegen dies ebenfalls für das *eif5a*-Gen. Ebenso wie dieses *eif5a*-Gen scheint auch das *dhs*-Gen in Pflanzen nicht mit dem Zellwachstum zu korrelieren, da unterschiedliche Entwicklungsstadien von Wurzel und Blatt keine auffälligen Unterschiede im Expressionsgrad aufwiesen. Möglicherweise hat also der eIF5A in der Pflanze eine andere Funktion als in den bisher untersuchten eukaryontischen Systemen, in denen der eIF5A essentiell für die Zellproliferation zu sein scheint (Kang & Hershy, 1994).

Im Gegensatz zum *dhs*-Gen wird das *hss*-Gen spezifisch nur in den Wurzeln exprimiert. Dies spiegelt die Modifikation der regulatorischen Elemente des *hss*-Gens gemäß den Anforderungen des sekundären Stoffwechsels, in den es integriert wurde, nach seiner Ableitung vom *dhs*-Gen wider.

#### 4.2.3 Gewebespezifische Lokalisation von HSS und DHS in *S. vernalis*

Die HSS konnte mit Hilfe von FITC-Markierungen sowie Immunogold und Silverenhancement in spezialisierten Zellen der Endodermis und der angrenzenden Parenchymzellen in direkter Nachbarschaft zum Phloem lokalisiert werden. In Zellen der Endodermis bzw. des Rindenparenchyms, die vor dem Xylem lagen, ebenso wie in Zellen des Perizykels konnte die HSS dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Endodermis, die sich in den untersuchten Geweben im primären Zustand befand, zeichnet sich dadurch aus, daß die radiären Zellwände mit einer dem Suberin ähnlichen Substanz imprägniert sind (Casparyscher Streifen). Hierdurch wird der apoplastische Wasser- und Nährsalztransport aus dem Rindenbereich in den Zentralzylinder der Wurzel unterbrochen bzw. findet eine Selektion der aufgenommenen Nährsalze am Plasmalemma statt (Lüttge et al., 1989). Für die in den Endodermiszellen bzw. den davorliegenden Parenchymzellen produzierten PAs bedeutet dies, daß sie ebenfalls symplastisch transportiert werden müssen. Für einen symplastischen Transport sprechen auch Untersuchungen, in denen PAs in WOKs von *Senecio*-Arten nach Fütterungsversuchen nicht an das umgebende Medium abgegeben wurden (Sander, 1991).

Im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel findet man sehr häufig, daß an der Biosynthese und Akkumulation von Sekundärstoffen verschiedene Organe und Zellen bzw. Kompartimente beteiligt sind. Zwei der insgesamt acht Enzyme, die an der Biosynthese des Isochinolinalkaloids Berberin beteiligt sind, sind beispielsweise ausschließlich in speziellen Membranvesikeln von *Berberis vulgaris* lokalisiert (Amann et al., 1996) und diejenigen für die Monoterpenindolalkaloide Vinblastin und Vincristin sind in verschiedenen, spezialisierten Zellen von *Catharanthus roseus* zu finden (St.-Pierre et al., 1999). In den Leukoplasten der sekretorischen Zellen der Drüsenschuppen von der Pfefferminze wurde die Limonensynthase, die für die Monoterpensynthese verantwortlich ist, lokalisiert (Turner et al., 1999) und die Myrosinase, verantwortlich für die Hydrolyse der Glucosinolate in Cruciferen, wurde ausschließlich in Myrosinzellen genannten Ideoblasten gefunden (Thangstad et al., 1990). Bei den Tropanalkaloiden zeigen sich bezüglich der Lokalisation besonders interessante Parallelen. Der Hauptsyntheseort ist ebenso wie bei den PAs die Wurzel und der Transport erfolgt von dort über das Xylem mit dem Transpirationsstrom in den Sproß (Kuchan, 1998). Die Hyoscyamin-6- $\beta$ -Hydroxylase (H6H) und Putrescin-N-Methyltransferase sind in

speziellen Zellen des Perizykels der Wurzelkulturen von *Hyoscyamus* und *Atropa*-Arten lokalisiert worden (Hashimoto et al, 1991, Suzuki et al., 1999). Promotoranalysen haben gezeigt, daß der H6H-Promotor häufiger in den Zellen an den Xylempolen exprimiert wird als vor dem Phloem. Dies könnte der Translokation des Scopolamins über das Xylem von der Wurzel zu den oberirdischen Teilen der Pflanze dienen (Kanegae et al., 1994). Auch zwei weitere an der Tropanalkaloidbiosynthese beteiligte Enzyme, die Tropanreduktase I (TRI) und II (TRII) wurden in der Wurzel lokalisiert. Die TRI kommt in der Endodermis und im Rindenparenchym, die TRII dagegen im Perizykel, der Endodermis und im Rindenparenchym (Nakajima & Hashimoto, 1999) vor. Die Kompartimentierung dieser Enzyme zeigt, daß die Zwischenprodukte zwischen dem Perizykel und der Endodermis transportiert werden müssen, damit Scopolamin im Fall der TRI bzw. Calystegine im Fall der TRII gebildet werden können.

"Ringelungs"-Experimente haben bei *S. vernalis* gezeigt, daß die Pyrrolizidinalkaloide über das Phloem zu den Orten ihrer Speicherung transportiert werden (Hartmann et al. 1989). Da zwischen dem Phloem und der Endodermis, wo die HSS als Schlüsselenzym der PA-Biosynthese lokalisiert ist, sich noch der Perizykel befindet, ergibt sich daraus die Frage, wie der Transport der PAs oder von Intermediaten zum Phloem erfolgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des TEM nach anatomischen Besonderheiten der HSS enthaltenen Zellen wie z.B. Plasmodesmen gesucht. Eine erhöhte Anzahl von Plasmodesmen könnte im Zusammenhang mit dem Transport der PAs oder den Intermediaten zum Phloem stehen, über das die Translokation erfolgt. Es konnte aber weder eine erhöhte Anzahl an Plasmodesmen noch andere anatomische Besonderheiten entdeckt werden. Für die PAs wäre ebenfalls interessant zu untersuchen, wo die weiteren an der Biosynthese beteiligten Enzyme (z.B. die postulierte Polyaminoxidase, die die Zyklisierung zum Trachelanthamidin katalysiert, s. Kap. 1.2.1) lokalisiert sind und ob gegebenenfalls ein inter-bzw. intrazellulärer Transport der Intermediate stattfindet.

Im Fall der HSS ist die zellspezifische Lokalisation wahrscheinlich verantwortlich für die Kompartimentierung der Homospermidin-Bildung, da von der HSS gebildetes Homospermidin im Gegensatz zu exogen zugeführtem Homospermidin vor dem Abbau durch Polyaminoxidasen geschützt ist (Böttcher et al. 1993).

Subzelluläre Untersuchungen der spezialisierten Zellen haben gezeigt, daß die HSS ausschließlich im Cytosol vorkommt, so daß eine Kompartimentierung auf organellärer Ebene ausgeschlossen werden kann.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von verschiedenen molekularbiologischen und immunhistologischen Untersuchungen die HSS in den Wurzeln von *S. vernalis* sowohl auf zellulärer als auch auf subzellulärer Ebene lokalisiert werden. Mit der Etablierung der immunhistologischen Methoden ist die Grundlage geschaffen worden, die Lokalisation der HSS in weiteren Pflanzen, bei denen wie z.B. bei *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae) sowie *Symphytum officinale* (Boraginaceae) die PA-Biosynthese ebenfalls ausschließlich in der Wurzel oder wie bei *Cynoglossum officinale* sowohl im Sproß als auch in der Wurzel stattfindet, zu untersuchen. Ein Vergleich der Lokalisation der HSS als Schlüsselenzym der Pyrrolizidinalkaloidsynthese ermöglicht somit weiterführende Aussagen über die Phylogenie PA-produzierender Pflanzen.

Mit den immunhistologischen Methoden ist es jedoch nicht gelungen die DHS zu lokalisieren. Alternativ zu den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden könnte eine Lokalisation über *in-situ*-Hybridisierung versucht werden. Problematisch hierbei ist jedoch, daß bei dem vermuteten geringen Vorkommen der DHS die Empfindlichkeit möglicherweise zu gering ist. Als Alternative könnte eine subzelluläre Lokalisation über ein Reportersystem mit einer  $\beta$ -Glucuronidase und/oder einem *green fluorescent protein* (GFP), die hinter den entsprechenden DHS-Promotor geschaltet sind, erfolgen. Einleitende Versuche sind bereits in dieser Arbeit durchgeführt worden, müssen jedoch noch optimiert werden. Eine weitere Methode, bei der die Sensitivität der PCR mit der Auflösung der Histologie vereint wird, ist die *in-situ* PCR. Hierbei erfolgt die PCR direkt an auf einem Objektträger fixierten Gewebe oder Zellen. Dieser Objektträger wird dann für die Dauer der Reaktion auf einen speziellen Heizblock eines Thermocyclers gelegt. Die Produkte weist man entweder direkt immunohistochemisch nach oder aber indirekt über eine zusätzliche *in situ*-Hybridisierung, die mit für das Amplikon spezifischen Oligonukleotidsonden durchgeführt wird. Führt man vor der Amplifikation eine reverse Transkription durch, kann auch RNA nachgewiesen werden. Die Lokalisation der DHS könnte dann Hinweise auf die noch unbekannte Funktion des Aktivierungsprozesses des eIF5A in Pflanzen geben.

Der Exon-Intron-Vergleich von *hss* und *dhs* konnte die Konserviertheit der genomischen Organisation belegen. Zusammen mit Übereinstimmungen in den kinetischen Daten der beiden Enzyme spricht dies für eine Akquirierung eines Enzyms des Sekundärstoffwechsels (HSS) aus dem Primärstoffwechsel (DHS) durch Genduplikation.

Die Expressionsmuster für die *hss* und *dhs* zeigen, daß der Promotor des Gens für die HSS im Lauf der Evolution an seine individuelle Funktion für den Sekundärstoffwechsel angepaßt wurde. Interessant wäre daher ein Vergleich der Promotoren für die beiden Gene. Dieser würde zur Erklärung beitragen wie sich die Rekrutierung von Sekundärstoffwechselenzymen aus dem Primärstoffwechsel auf Ebene der Promotoren widerspiegelt.

## 5 Zusammenfassung

1. Mit Hilfe bereits vorliegender cDNA-Sequenzen der HSS und DHS aus *S. vernalis* (Ober & Hartmann, 2000) konnte die genomische Organisation der *hss* und *dhs* untersucht werden. Beide Gene enthalten je fünf Introns, die sich aber sowohl in der Länge als auch der Sequenz unterscheiden. Die Lage der homologen Exons dagegen stimmt exakt überein, so daß auch die Intronpositionen und Intronphasen konserviert sind.
2. Die Ergebnisse von Southern-Blots deuten daraufhin, daß mehr als ein Gen für die HSS in Wurzeln von *S. vernalis* exprimiert wird. Die Untersuchungen der DHS aus *S. vernalis* deuten dagegen nur auf ein Gen hin. Datenbankrecherchen haben ergeben, daß die *dhs* in anderen Organismen (*A. thaliana* und *D. melanogaster*, *H. sapiens*) ebenfalls als "single copy"-Gen vorkommt.
3. Die Expressionsmuster der *hss* und *dhs* in *S. vernalis* sowie der *dhs* in *N. tabacum* wurden mit zwei verschiedenen Methoden (Northern-Blot und RT-PCR) untersucht. In *S. vernalis* wird das *hss*-Gen danach ausschließlich in den Wurzeln exprimiert, wohingegen das Gen für die DHS in beiden Pflanzen in allen untersuchten Pflanzenteilen exprimiert wird.
4. Die bereits beschriebene hohe Ähnlichkeit zwischen der HSS und DHS aus *S. vernalis* auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (Ober & Hartmann, 1999b) hat sich auch in Western-Blots widerspiegelt. Es wurden Kreuzreaktivitäten zwischen der HSS und dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die DHS bei Proteinkonzentrationen von 250 und 50 ng festgestellt. Im umgekehrten Fall traten ebenfalls Kreuzreaktivitäten bis zu einer Konzentration von 10 ng HSS-Protein auf.
5. Für die Lokalisation der HSS in den Wurzeln von *S. vernalis* konnte durch Unterfütterungsexperimente mit HSS- und DHS-Protein unterschiedlicher Konzentrationen die Spezifität des affinitätsgereinigten HSS-Antikörpers bei den Gewebemarkierungen belegt werden.



6. Die HSS konnte durch Immunolokalisation (FITC und Immunogold mit Silverenhancement) in den Wurzeln von *S. vernalis* in Gruppen von spezialisierten Zellen der Endodermis und der angrenzenden Parenchymzellen detektiert werden. Diese Zellen liegen in direkter Nachbarschaft zum Phloem, dem Leitgewebe, über das PAs in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

AMANN, M., WANNER, G., ZENK, M. (1986): Intracellular compartmentation of two enzymes of berberine biosynthesis in plant cell cultures. *Planta* 167, 310-320

APOSTOLAKOS, M.J., SCHUERMANN, W.H.T., FRAMPTON, M.W. (1993): Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 213, 277-284

BEVEC, D., JAKSCHE, H., OFT, M., WÖHL, T., HIMMELSPACH, M., PACHER, A., SCHEBESTA, M., KOETTNITZ, K., DOBROVNIK, M., CSONGA, R., LOTTSPICH, F., HAUBER, J. (1996): Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the cofactor eIF5A. *Science*, 271, 1858-1860

BIRECKA, H., BIRECKI, M., FROHLICH, M.W. (1987): Evidence for arginine as endogenous precursor of necines in *Heliotropium*. *Plant Physiology* 84, 42-46

BÖTTCHER, F., ADOLPH, R., HARTMANN, T. (1993): Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 32, 679-689

BÖTTCHER, F., OBER, D., HARTMANN, T. (1994): Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Canadian Journal of Chemistry* 72, 80-85

BOPPRÉ, M. (1984): Redefining "pharmacophagy". *Journal of Chemical Ecology* 10, 1151-1154

BOPPRÉ, M. (1986): Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (Pyrrolizidine Alkaloids). *Naturwissenschaften* 73, 17-26

BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-252

BUSSE, J., AULING, G. (1988): Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within Protobacteria. *Systematics of Applied Microbiology* 11, 1-8

Catalfamo, J. L.; Martin, W. B.; Birecka, H. (1982) Accumulation of alkaloids and their necines in *Heliotropium curassavicum*, *H. spathulatum* and *H. indicum*. *Phytochemistry* 21 (11): 2669-2675

CHAMOT, D., KUHLEMEIER, C. (1992): Differential expression of genes encoding the hypusine- containing translation initiation factor, eIF5A, in tobacco. *Nucleic Acid Research* 20, 665-669

CHEN, K.Y., LIU, A.Y.C. (1997): Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biological Signals* 6, 105-109

DARLING, D.C., BRICKELL, P.M. (1996): Nucleinsäureblotting. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin Oxford

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. (1990) : Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15

DRESSELHAUS, T., CORDTS, S., LÖRZ, H. (1999): A transcript encoding translation initiation factor eIF5A is stored in unfertilized egg cells of maize. *Plant Molecular Biology* 39, 1063-1071

EHMKE, A., VON BORSTEL, K., HARTMANN, T. (1988): Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *S. vulgaris* L. *Planta* 176, 83-90

FLEGLER, S., L., HECKMANN JR., J.W., KLOMPARENS, K.L.: Elektronenmikroskopie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995

FRÖLICH, C. (1996): Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae. Dissertation, TU Braunschweig

- GIERL, A., FREY, M. (2001): Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* (Online-Publikation Juni 2001)
- GOUET, P., COURCELLE, E., STUART, D., METOZ, F. (1999): ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308
- GRASER, G., HARTMANN, T. (2000): Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 211, 239-245
- HAMANA, K., MATSUZAKI, S. (1982): Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 91, 1321-1328
- HAMANA, K., MIYAGAWA, K., MATSUZAKI, S. (1983): Occurrence of *sym*-homospermidine as the mayor polyamine in nitrogene-fixing cyanobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communocations* 112, 606-613
- HARBORNE, J.B. (1993): Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London, 4<sup>th</sup> Edition
- HARLOWE, E., LANE., D.: Antibodies, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- HARTMANN, T. (1985): Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Plant Systematics and Evolution* 150, 15-34
- HARTMANN, T, TOPPEL, G. (1987): Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *S. vernalis* . *Phytochemistry* 26, 1639-1634
- HARTMANN, T., SANDER, H., ADOLPH, R., TOPPEL, G. (1988): Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta* 175, 82-90

HARTMANN, T., EHMKE, A., EILERT, U., VON BORSTEL, K., THEURING, C. (1989): Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid-N-oxides in *Senecio vulgaris*. *Planta* 177, 98-107

HARTMANN, T. (1992): Alkaloids: Biochemistry, physiology and chemical ecology by example of the pyrrolizidine alkaloids. *Frontiers and new horizons in amino acid research*, K. Takai (ed.) Elsevier Science Publisher B.V., 65-76

HARTMANN, T., WITTE, L. (1995): Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Pelletier, S.W., ed.) Vol. 9, Pergamon, Oxford, 155-233

HARTMANN, T. (1996): Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia et Applicata* 80, 177-188

HARTMANN, T., DIERICH, B. (1998): Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* 206, 443-451

HARTMANN, T. (1999): Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207, 483-495

HASHIMOTO, T., TAMAKI, A., AMANO, Y., KOHNO, J., IWANARI, H., USUDA, S., YAMADA, Y. (1991): Hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of root. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4648-4653

HENIKOFF, J.G., HENIKOFF, S. (1996): Blocks Database and its Applications. *Methods in Enzymology*, 266, 88-104

HERBERT, R.B. (1989): The biosynthesis of secondary metabolites. 2<sup>nd</sup> Edition, Chapman and Hall, London

HODGSON, E. (1985): Microsomal mono-oxygenases. in Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (eds.) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 11. Pergamon Press, Oxford, 225-321

- JENNET-SIEMS, K., SCHIMMING, T., KALOGA, M., EICH, E., SIEMS, K., GUPTA, M.P., WITTE, L., HARTMANN, T. (1998): Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry* 47, 1551-1560
- KADEREIT, J.W. (1998): The origin of *Senecio vulgaris* (Asteraceae). *Plant Systematic Evolution* 145, 135-153
- KANEGAE, T., KAJIYA, H., AMANO, Y., HASHIMOTO, T., YAMADA, Y. (1994): Species-dependent expression of the hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase gene in the pericycle. *Plant Physiology* 105, 483-490
- KANG, H.A., HERSHEY, W.B. (1994): Effect of initiation factor eIF5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3934-3940
- KHAN, H.A., ROBINS, D.J. (1985): Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis of  $^{14}\text{C}$ -labelled homospermidines and their incorporation into retronecine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans*, 819-824
- KUTCHAN, T.M., AYABE, S., KRUEGER, R.J., COSCIA, E.M., COSCIA, C.J. (1998): Cytodifferentiation and alkaloid accumulation in cultures cells of *Papaver bracteatum*. *Plant Cell Reports* 2, 281-284
- LEITCH, A.R., SCHWARZACHER, T., JACKSON, D., LEITCH, I.J. (1994): *In situ*-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin Oxford
- Lewin, B. (2000): *Genes VII*. Oxford University Press
- LINDIGKEIT, R. (1996): Pyrrolizidinalkaloid-speichernde Insekten: Mechanismen der Alkaloidresorption und Charakterisierung einer spezifischen Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenase. Dissertation, TU Braunschweig

LINDIGKEIT, R., BILLER, A., BUCH, M., SCHIEBEL, H.M., BOPPRÉ, M., HARTMANN, T. (1997): The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* 245, 626-636

LUCKNER, M. (1990): Secondary metabolism in Microorganisms, Plants and animals. G. Fischer, Jena (3<sup>rd</sup> ed.)

LÜTTGE, U., KLUGE, M., BAUER, G. (1989): Botanik. VCH Verlagsgesellschaft mbH

MATSUZAKI, S., HAMANA, K., IMAI, K., MATSUURA, K. (1982): Occurrence in high concentrations of N<sup>1</sup>-acetylspermidine and sym-homospermidine in the hamster epidermis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107, 307-313

MATTOCKS, A.R. (1986): Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press, London

MEHTA, A.M., SAFTNER, R.A., SCHAEFER, G.W., MATTOO, A.K. (1991): Translational modification of an 18-kilodalton polypeptide by spermidine in rice as eukaryotic translation initiation factor 5A. *Plant Physiology* 106, 1413-1419

MOTHES, T. (1955): Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology* 6, 393-432

MURPHEY, R.J., GERNER, E.W. (1987): Hypusine formation in protein by a two-step process in cell lysates. *Journal of Biological Chemistry* 262, 15033-15036

NAKAJIMA, K., HASHIMOTO, T. (1999) Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant Cell Physiology* 1099-1107

NOWACKI, E., BYERRUM, R.U. (1962): A study on the biosynthesis of *Crotalaria* alkaloids. *Life Science* 5, 157-161

OBER, D. (1997): Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation TU-Braunschweig

OBER, D., HARTMANN, T. (1999a): Deoxyhypusine Synthase from tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45), 32040-32047

OBER, D., HARTMANN, T. (1999b): Homospermidinesynthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (26), 14777-14782

OBER, D., HARTMANN, T. (2000): Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology* 44, 445-450

PAY, A., HEBERLE-BORS, E., HIRT, H. (1991): Isolation and sequence determination of the plant homologue of the eukaryotic initiation factor 4D cDNA from alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Molecular Biology* 17, 927-929

PICHON, M., JOURNET, E.-P., DEDIEU, A., DE BILLY, F., TRUCHET, G., BARKER, D. (1992): *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *The Plant Cell* 4, 1199-1211

PARK, M.H., WOLFF, E.C., FOLK, J.K. (1993): Hypusine : its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 4, 95-104

RANA, J., ROBINS, D.J. (1983): Intact incorporation of [1,9-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-homospermidine into retronecine. *Journal of Chemical Research (S)*, 146-147

RASK, L., ANDRÉASSON, E., EKBOM, B., ERIKSSON, S., PONTOPPIDAN, B., MEIJER, J. (2000): Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42, 93-113



ROBINS, D.J. (1989): Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. Chemical Society Reviews 18, 375-408

ROSORIUS, O., REICHART, B., KRÄTZER, F., HEGER, P., DABAUVALLE, M.-C., HAUBER, J. (1999): Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. Journal of Cell Science 112, 2369-2380

SANDER, H. (1991): Zur Physiologie und Biochemie der Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden und Polyaminen in Wurzelorgankulturen der Gattung *Senecio*. Dissertation, TU-Braunschweig

SANDER, H., HARTMANN, T. (1989): Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultures roots of *Senecio crucifolius*. Plant Cell Tissue Organ Culture 18, 19-31

SESSIONS, A., WEIGEL, D., YANOFSKY, M.F. (1999): The *Arabidopsis thaliana* meristem layer 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. The Plant Journal 20 (2), 259-263

SCHMITZ, G.G., WALTER, T., SEIBL, R., KESSLER, C. (1991): Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten Digoxigenin by tailing with terminal transferase. Analytical Biochemistry 192, 222-231

SPENSER, I.D. (1985): Stereochemical aspects of the biosynthetic routes leading to the pyrrolizidine and quinolizidine alkaloids. Pure & Applied Chemistry 57, 453-470

SRIVENUGOPAL, K.S., ADIGA, P.R. (1980): Enzymatic synthesis of *sym*-homospermidine in *Lathyrus sativus* (grass pea) seedlings. FEBS Letters 112, 260-264

ST.-PIERRE, B., DE LUCA, V. (1995): A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 109, 131-139

SUZUKI, K., YAMADA, Y., HASHIMOTO, T. (1999): Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiology* 40 (3), 289-297

SWAIN, T. (1977): Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 479-501

THANGSTAD, O.P., IVERSEN, T.-H., SLUPPHAUG, G. BONES, A. (1990): Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L.. *Planta* 180, 245-248

THOLL, D., OBER, D., MARTIN, W., KELLERMANN, J., HARTMANN, T. (1996): Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodospseudomonas viridis*. *European Journal of Biochemistry* 240, 373

TOPPEL, G. WITTE, L. RIEBESEHL, B. VON BORSTEL, K. HARTMANN, T. (1987): Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *S. vernalis* species. *Plant Cell Reports* 6, 466-469

TURNER, G., GERSHENZON, J. NIELSON, E.E., FROELICH, J.E. CROTEAU, R. (1999): Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120, 879-886

VON BORSTEL, K., WITTE, L., HARTMANN, T. (1986): Selective uptake of pyrrolizidine alkaloids by cell suspension cultures from pyrrolizidine alkaloid producing species. *Plant Cell Reports* 5, 39-42

VAN DAM, N.M., WITTE, L., THEURING, C., HARTMANN, T. (1995): Distribution, biosynthesis and turn-over of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* 39, 2, 287-292

WITTE, L., EHMKE, A., HARTMANN, T. (1990): Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids: from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77, 540-543

## 7 Anhang

Abb. 7.1: Genomische Sequenz der *hss* aus *S. vernalis*:

```

atggccgagtc aaacaaagaagccatcgacagtgcgagggtctaattgattcaagggatcc
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccggctcagtttg tttcttcggtagctgtcacgctccagattacataagttccctagg
M A E S N K E A I D S A R S N V F K G S -

gagagtttagaaggcacttgtgctaaaattggtggctatgatttcaacaatggcattgat
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ctctcaaattcttcg tgaacacgattttaaccaccgataactaaagttgttaccgtaacta
E S L E G T C A K I G G Y D F N N G I D -

cactcaaagcttctt aaatccatggtttcgaccggattccaagcttctaattcttggtgat
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
gtgagtttcgaagaat ttaggtaccaaagctggcctaagggttcgaagattagaaccacta
H S K L L K S M V S T G F Q A S N L G D -

gctatgataatcacaa atcaaattggttaagtttatcgctctcgcatctactcatcttaaagg
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cgatactattagtg ttttagtttaccattcaaatagcgagagcgtaatgagtagaatttcc
A M I I T N Q M .....

tcattactcatatacg atatataaacttcggttgaatctgatatgatctttatattaaacat
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
agtaatgagtatatg ctatatattgaagcaacttagactatactagaaatataatttgta
.....

agcttttatgatttat atgttttgactaccaatcttatttatgattgaagcttgagt
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
tcgaaaatactaaat atacaaaacgtgatggttaaagaataaataacttaacttcgaactca
.....L E W -

ggaggctatctcatga cgaagtaccagaacattgcagcgaggaggagaagaagaaccgag
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
cctccgatagagtact gcttcattggtcttgtaacgtcgctcctcctcttcttcttggtc
R L S H D E V P E H C S E E E K K N R E -

```

```
agtcctgtcaagtgcaaaatcttcctaggggtttacgtcaaacctcatttcttcgggtgttc
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
tcagacagttcacgtttttagaaggatcccaaatgcagtttggagtaaagaagcccacaag
S V K C K I F L G F T S N L I S S G V R -

gggagactatcttggttatctaactcaacatcgatatgggttagtatcattcgctacttgatga
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ccctctgataaacaatagattgagttgtagcataccaatcatagtaagcgatgaactact
E T I C Y L T Q H R M .....

ctattcatatatccatttcaatgttggttgaacaatattgtacgtatttatatataaaca
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
gataagtatataggtaaagttacaacaaacttggtataacatgcataaatatatatattgt
.....

tatttcgggattagaaataacaccattcaacgttttgatatactttactaaatcttatgtt
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
ataaagcctaattctttattgtggttaagttgcaaaactatatgaaatgatttagaatacaa
.....

acttaaatttcagggtggatgttcttctgtgacaacaacagggtggcattgaggaagatttcat
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
tgaatttaaagtcacctaagaacactgttgttgtccaccgtaactccttctaaagta
.....V D V L V T T T G G I E E D F I -

aaaatgccttgcaagcacttacaaaggaaaatcttctctacccggagctgatttgagatc
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
ttttacggaacgttcgtgaatgtttccttttaaaagagatgggcctcgactaaactctag
K C L A S T Y K G K F S L P G A D L R S -

gaaaggggttaaatacgcatcgtgtaacttgatagtgccctaatgataattacatcaagttcga
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
ctttcccaatttagcgtaaccattgaactatcacggattactattaatgtagttcaagct
K G L N R I G N L I V P N D N Y I K F E -

ggactggattatcccaatttttgaccaaatgttgatagaacaaaaaacacagggtactata
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
cctgacctaataggggttaaaaactgggtttacaactatcttggtttttgtgtccatgatat
D W I I P I F D Q M L I E Q K T Q .....
```

```
ttgtcacatcttttacataaacattatcatttcaaatttaaaaagttagtattaatttat
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
aacagtgtagaaaatgtatttgaatagtaaagtttaaatTTTTcaatcataattaaata
.....

ttcaaattttgttttttacagaatgttttatggacaccatcaagaatgatagcacgttta
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
aagtttaaaacaaaaaatgtcttacaaaatacctgtggtagttcttactatcgtgcaa
.....N V L W T P S R M I A R L -

gggaaggaaattaataacgagacttcatatctgtattgggcatataaggtaattaatcac
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
cccttcctttaattattgctctgaagtatagacataacccgtatattccattaattagt
G K E I N N E T S Y L Y W A Y K .....

atgtttcgacactcatttgtttcgtaatgtaactccaagttaagaaaaacttacatcata
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
tacaaagctgtgagtaaacaagcattacattgaggttcaattcttttgaatgtagtat
.....

acatggtttcagaacaatatccccgtcttctgccccctcaataacagatggctctatcgga
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
tgtaccaaaagtcttgttataggggcagaagacggggagttattgtctaccgagatagc
.....N N I P V F C P S I T D G S I G -

gacatgttatacttccattcagtttccaatccagggtccagggtcttgtgtcgatatcgta
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
ctgtacaatatgaaggtaagtc aaagggttaggtccagggtccagaacaacagctatagc
D M L Y F H S V S N P G P G L V V D I V -

caagggtgaactgaaactgaatataaatggaatgtataatatcatcaaaattttatgtact
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
gttccacttgactttgacttatatttaccttacatattatagtagttttaaaatacatga
Q .....

aattattagttgtacgtaacgagttacacagatgtcatagcgatggataatgaggctgtg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
ttaataatcaacatgcattgctcaatgtgtctacagtatcgctacctattactccgacac
.....D V I A M D N E A V -
```

```
catgcaagtcctcagaagactgggataatcatttttaggaggagggttaccaaagcatcac
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
gtacgttcaggagtcttctgaccctattagtaaaatcctcctcccaatggtttcgtagtg
H A S P Q K T G I I I L G G G L P K H H -

atttgcaatgcgaatatgatgcgtaatgggtgcagatttcgctgtttttatcaacaccgcc
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
taaacgttacgcttatactacgcattaccacgtctaaagcgacaaaaatagttgtggcgg
I C N A N M M R N G A D F A V F I N T A -

caggagtatgatggcagtgattctggcgctcgtcctgatgaagccgtctcatgggggaaa
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
gtcctcatactaccgtcactaagaccgcgagcaggactacttcggcagagtacccccttt
Q E Y D G S D S G A R P D E A V S W G K -

attagtagtacgggtaaagctgtgaagggtgcactgtgatgcaactattgcattcccattg
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
taatcatcatgcccatttcgacacttccacgtgacactacgttgataacgtaagggtaac
I S S T G K A V K V H C D A T I A F P L -

cttgttgctgaaacctttgccgtaaagaaagagaaggcatctaaagtcaatggtttttaa
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
gaacaacgactttggaaacggcatttctttctcttccgtagatttcagttaccaaaaaatt
L V A E T F A V K K E K A S K V N G F * -
```

Abb. 7.2: Genomische Sequenz der *dhs* aus *S. vernalis*:

```

atggaagaatctatgaaacaagcctcggatggagaacttgaggcgggtgtatccaaa
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccttcttagatactttgttcggagccactacctcttgaactccagccaacataggttt
M E E S M K Q A S V M E N L R S V V S K -

gaatcggagagtttagaaggcacttgcgctaaaatacgtggctacgatttcaacaatggg
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
cttagcctctcaaactcttcggtgaacgcgattttatgcaccgatgctaaagttgttacc
E S E S L E G T C A K I R G Y D F N N G -

attgattattcacagattcttaaattccatgggtttcaactggattccaagcttctaattctt
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
taactaataagtgtctaagaatttaggtaccaaagttgacctaaaggttcgaagattagaa
I D Y S Q I L K S M V S T G F Q A S N L -

ggtgacgctattgaaaccgtgaatcagatggtacacactttctacttgatttaagagatt
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ccactgcgataactttggcacttagtctaccatgtgtgaaagatgaactaaattctctaa
G D A I E T V N Q M .....

taaaagaattgagttgtttttttcttgaattattatttgattttttttcatattagcct
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
attttcttaactcaacaaaaaagaacttaataataaactaaaaaaaaagtataatcgga
.....

tagcctttgtgtgaaattgttcattttatttttagccgggtgttagttaaaatggatgatcgt
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
atcggaaacacactttaacaagtaataaaaaatcgccacaatcaattttaccactagca
.....

tttttgttgaattcggttgaaaaagaagttctttaatccacttatatatccctgacaaaata
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
aaaaacaacttaagcaactttttcttcaagaaattagggtgaatatatagggactgtttat
.....

aaaaaggaaagcaacaaagggtttgtagacggaaatagtatgattttgattgggttcggtt
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
tttttcctttcggtttgtttccaaacatctgcctttatcatactaaaactaaccaagccaa
.....

```

```
ttatgattatagctagattggaggctttctcatgaacaagtaacggaagattgcagcgag
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
aataactaatatcgatctaacctccgaaagagtacttggtcattgccttctaacgctcgctc
.....L D W R L S H E Q V T E D C S E -

gaagaaaagaatcctacatacagagagtctataaaatgcaaaatcttcctagggttcaact
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
cttcttttcttaggatgtatgtctctcagatatatttacgttttagaaggatcccaagtga
E E K N P T Y R E S I K C K I F L G F T -

tcaaacctcatctcatctggtggtcgagatatatttcgatatctagttcaacatcatatg
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
agtttgaggtagagtagaccacaagctctataataagctatagatcaagttgtagtatac
S N L I S S G V R D I I R Y L V Q H H M -

gtcgatgtgattgtgacaacaactggtggcattgaggaagatctcataaaatgccttgca
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
cagctacactaacactggttggtgaccaccgtaactccttctagagtattttacggaacgt
V D V I V T T T G G I E E D L I K C L A -

gacacattcaaaggtgaattttctctacctggtgccgaattgcggttcgaaaggactaaat
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
ctgtgtaagtttccactttaaagagatggaccacggcttaacgcaagctttcctgattta
D T F K G E F S L P G A E L R S K G L N -

cgtattgggaacttggttggtgccgaatgacaactattgtaagtttgaggattggattatt
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
gcataacccttgaacaaccacggcttactggtgataacattcaaactcctaacctaataa
R I G N L L V P N D N Y C K F E D W I I -

ccgatatttgaccaaattggttgaagaacaaaaagcaaaggtatttatattttatatgtata
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
ggctataaactggtttacaaccttcttggttttctggtttccataatataaaatatacatat
P I F D Q M L E E Q K A K .....

ctttttataatttataatctcagatttgaaaaggctgtattgattacgagtggtgtttaat
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
gaaaaatattaaatatttagagtctaaacttttccgacataactaatgctcacacaaaatta
.....
```



```
taacagaatgtggtgtggacaccatcaaaactaataatgcggttggggaaggaaattaat
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
attgtcttacaccacacctgtggtagttttgattattacgcaaacccttcctttaatta
.....N V V W T P S K L I M R L G K E I N -

aacgagagttcatactctgtattgggcgtataaggtaatcacatgttcatacttttccgt
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
ttgctctcaagtatagacataaaccgcataattccattagtggtacaagtatagaaaaggca
N E S S Y L Y W A Y K .....

tacatgtttacaagtccttgctctcgcggtattttacagactcctctaatttcaaagggtta
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
atgtacaatgttcaggaacgagagcgccataaaatgtctgaggagattaaagtttccaat
.....

ctatgattcaacaaagttatattttctaatttattcttccatggtttcatcactgatcctt
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
gatactaagttgtttcaatataaagattaaataagaaggtaccaaagtagtgactaggaa
.....

ttgtaataataacactcattggatccttgccctcccgaatccaatatgtttatttcattat
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
aacattattattgtgagtaacctaggaacggagggttaggttatacaaataaagtaata
.....

aaaatcgaatgtagcttggtcgatattcaaagggtagaaaatgacaactaatagattatg
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
tttttagcttacatcgaacaagctataagtttcccatcttttactgttgattatctaatac
.....

gacagaacaattaggtcccctttctgtcagtgatgagtcgggtctctcttatctttgtg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
ctgtcttggttaatccaggggaaagacagtcacatactcaggccagagagaatagaaacac
.....

gtgctttttggccttgacttacgccatgacatgattaaatttattgttgaacgatatccc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
cacgaaaaaccggaactgaatgcggtactgtactaatttaataacaacttgctataggg
.....N D I P -
```

```

      agtcttctgccccgggcttgacagatggctctcttggagacatgctatatattccatacttt
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      tcagaagacggggccgaactgtctaccgagagaacctctgtacgatataaagggtatgaaa
      V F C P G L T D G S L G D M L Y F H T F -

      tcgcaatcctgggtcttattgtcgacgtagtacaagggtgagctgattctcacattttgact
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
      agcgttaggaccagaataaacagctgcatcatgttccactcgactaagagtgtaaaactga
      R N P G L I V D V V Q .....

      tgcgtgtccaatcaaacaaatattttaagctgacaagtgtaaaaacagatatattgagcga
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
      acgcacagggttagtttgtttataaaaattcgactgttcacatttttgtctataaaactcgct
      .....D I * A I -

      ttaacagtgaggctgtgcatgcaaaccctagaaagaccgggatgatcatttttaggaggag
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
      aattgtcactccgacacgtacgtttgggatctttctggccctactagtaaaatcctcctc
      N S E A V H A N P R K T G M I I L G G G -

      ggttgccaaaacatcacatttgcaatgcaaatatgatgcgtaatggtgctgattacgccg
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
      ccaacgggttttgtagtgtaaacgtttacgtttatactacgcattaccacgactaatgcggc
      L P K H H I C N A N M M R N G A D Y A V -

      ttttcatcaacaccgcacaggaatttgatggtagtgattctggtgctcgtcctgatgaag
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
      aaaagtagttgtggcgtgtccttaaactaccatcactaagaccacgagcaggactacttc
      F I N T A Q E F D G S D S G A R P D E A -

      ctgtctcatggggaaaaatacgtgggttctgctaaatccgtgaagggtttctttattctcgt
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
      gacagagtacccttttttatgcaccaagacgatttaggcacttccaaagaaataagagca
      V S W G K I R G S A K S V K .....

      cttttttgttactccatctataactaactctagcttacgatcgggaacttccaaaaaaatg
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
      gaaaaaacaatgaggtagatatgattgtagatcgaatgctagccttgaagggttttttttac
      .....
```

```

      tgatctatattttatttatataaacagttccaatgctagtcattcatgttgcttgcttgcgat
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
      actagatataaataaatatattgtcaagggttacgatcagtaagtacaacgaacaaagcta
      .....

      ccaggtgcattgtgatgcaactattgcattcccgttacttggtgcagaaacatttgctgc
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
      ggtccacgtaaacactacgttgataacgtaagggcaatgaacaacgtctttgtaaacgacg
      ....V H C D A T I A F P L L V A E T F A A -

      aaagagagagaagtcagctgagccgagttcctga
2041 -----+-----+-----+----- 2074
      tttctctctcttcagtcgactcgggtcaaggact
      K R E K S A E P S S * -
```